

**ZUR REAKTION VON FETTSÄURESYNTHETASE
AUS HEFE MIT JODACETAMID**

**UNTERSUCHUNGEN ZUR CHEMISCHEN STRUKTUR
UND WIRKUNGSWEISE DER KONDENSIERENDEN
ENZYMKOMPONENTE DES MULTIENZYMKOMPLEXES**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

GEORG-BURKHARD KRESZE

München 1976

**ZUR REAKTION VON FETTSÄURESYNTHESE
AUS HEFE MIT JODACETAMID**

**UNTERSUCHUNGEN ZUR CHEMISCHEN STRUKTUR
UND WIRKUNGSWEISE DER KONDENSIERENDEN
ENZYMKOMPONENTE DES MULTIENZYMKOMPLEXES**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

GEORG-BURKHARD KRESZE

München 1976



1. Berichterstatter: Prof.Dr.F.Lynen
 2. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Hartmann
- Tag der mündlichen Prüfung: 14.Juni 1976

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553820_0022

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 1972 bis Januar 1976 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen am Institut für Biochemie der Universität München ausgeführt.

Herrn Professor Dr. F. Lynen danke ich herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die er dieser Arbeit und mir persönlich jederzeit zuteil werden ließ.

Für wertvolle Hilfe und zahlreiche Anregungen, insbesondere während des ersten Teils der Arbeit, danke ich Herrn Professor Dr. D. Oesterhelt, jetzt Universität Würzburg.

Mein besonderer Dank gilt Fr. Liesel Schuhmann für ihre ausgezeichnete, geschickte und zuverlässige Mitarbeit seit September 1974.

Herrn Prof. Dr. E. Schweizer, jetzt Universität Erlangen, danke ich für die Zusammenarbeit bei den in Kapitel 5 dargestellten Versuchen.

Der Max-Planck-Gesellschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gilt mein Dank für zeitweilig gewährte Stipendien.

Ferner möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen danken, die durch Diskussionen und praktische Hilfe diese Arbeit unterstützten.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung 1
1.1	Sulphydrylgruppen in Proteinen 1
1.2	Fettsäuresynthetase 2
1.3	Fettsäuresynthetase und Jodacetamid. 5
2	Die Hemmung der Fettsäuresynthetase durch Jodacetamid: Kinetik und Stöchiometrie 7
2.1	Hemmungskinetik 7
2.2	Durch IAM gehemmte Enzymkomponente 8
2.3	Schutz der Synthetase vor Inhibierung durch IAM. . 10
2.3.1	Schutz durch Acetylbeladung 10
2.3.2	Schutz durch Thiole ("Stoplösungen") 11
2.4	Zur Stöchiometrie der Reaktion von IAM mit Synthetase 13
2.5	Gleichzeitigkeit von Inaktivierung und CAM-Einbau 16
2.6	Wirkung anderer Hemmstoffe auf die Fettsäuresynthetase 18
2.6.1	Jodessigsäure 18
2.6.2	Andere α -Halogen-carbonsäurederivate 19
2.6.3	N-Äthyl-maleinimid 21
2.6.4	Fluoreszenz-markierende Reagentien 23
2.6.5	Weitere Hemmstoffe 25
2.7	Wirkung von N-Acetyl-cysteamin auf die Kinetik der Fettsäuresynthese mit Modells substraten. 25
3	Die chemische Natur der Carboxamidomethyl-Bindungsstellen der Fettsäuresynthetase 28
3.1	Beladung der Synthetase mit ^{14}C -IAM und salzsaure Hydrolyse 28
3.2	Identifizierung des unbekannten Produkts "X". . . 31
3.2.1	^{14}C -CAM-Beladung von GAPDH. 31
3.2.2	Umwandlungsprodukte von SCMC 33
3.2.3	SCMC-Lactam und SCMC-Lactam-sulfon 34
3.3	Bildungsbedingungen von SCMC-Lactam-sulfon . . . 38
3.4	Zersetzung von SCMC-Sulfon bei der salzsauren Proteinhydrolyse 40

4	Die chemische Umgebung der CAM-Bindungsstellen . . .	43
4.1	Allgemeines	43
4.2	Tryptische Spaltung von ^{14}C -CAM-Synthetase . . .	44
4.3	CAM-Bindungsstelle und periphere SH-Gruppe . . .	40
4.4	Reinigung eines tryptischen CAM-Peptids	52
4.4.1	Allgemeines	52
4.4.2	Trennung nach Größe: Verhalten von T_A und T_B bei der Gelfiltration	52
4.4.3	Trennung nach Ladung: Verhalten von T_A und T_B bei der Ionenaustauschchromatographie	54
4.4.4	Reinigungsgang für das Peptid T_B	54
4.4.5	Verhalten von T_A und T_B bei der Hochspannungs- papiererelektrophorese	59
4.4.6	Verhalten von T_B bei der Papierchromatographie . . .	63
4.4.7	Diskussion zu Reinigung und Zusammensetzung von T_B	64
4.5	Die Sequenz des tryptischen CAM-Peptids T_B . . .	68
4.5.1	Methodisches	68
4.5.2	Sequenzierung von T_B	70
4.5.3	Diskussion zu 4.5 und Vergleich mit Thiolase . . .	72
5	Lokalisierung der peripheren SH-Gruppe auf der Polypeptidkette A des Multienzymkomplexes . . .	73
5.1	Allgemeines	73
5.2	Lokalisierung der peripheren SH-Gruppe	74
5.3	Diskussion zu 5.2	78
5.4	Zur Möglichkeit der Half-site-Reaktivität von Fettsäuresynthetase	79
5.4.1	Allgemeines	79
5.4.2	Experimenteller Test auf Half-site-Reaktivität . .	85
6	MalonylCoA-Decarboxylase	92
6.1	Nachweis der Decarboxylase	92
6.2	Bildungskinetik der Decarboxylase	94
6.3	Einige Eigenschaften der MalonylCoA-Decarboxylase	101
6.3.1	Stabilität	101
6.3.2	Hemmverhalten	102
6.3.3	Substratspezifität	103
6.3.4	Start der Fettsäuresynthese mit IAM	103
6.4	Diskussion: Zum Mechanismus der Decarboxylierung von MalonylCoA	105

7	Experimenteller Teil	113
7.1	Allgemeines	113
7.1.1	Verwendete Geräte	113
7.1.2	Materialien	114
7.1.3	Allgemeine analytische Methoden	115
7.1.3.1	Proteinbestimmung	115
7.1.3.2	Radioaktivitätsbestimmung	116
7.1.4	Verzeichnis der verwendeten Laufmittelsysteme	116
7.1.5	Anreicherung und Test von Fettsäuresynthetase	117
7.1.5.1	Anreicherung	117
7.1.5.2	Synthetase-Standardtest	117
7.1.5.3	Fettsäuresynthese aus S-Crotonyl-N-acetyl-cysteamin	119
7.2	Versuchsbeschreibungen zu Kap.2	122
7.2.1	Inhibierung der Synthetase durch IAM	122
7.2.2	Gehemmte Teilreaktion	122
7.2.3	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion von Cystein mit IAM (0°C, pH 6,5)	122
7.2.4	Stöchiometrie der IAM-Beladung	124
7.2.5	Wirkung anderer SH-Reagentien	124
7.3	Versuchsbeschreibungen zu Kap.3	125
7.3.1	Salzsaure Proteinhydrolyse	125
7.3.2	Papierchromatographie	125
7.3.3	Perameisensäure-Oxydation	126
7.3.4	Reaktion von GADH mit ¹⁴ C-IAM	126
7.3.5	Versuch des Ausfällens von "X" als Ca-Oxalat	127
7.3.6	Herstellung von SCMC-Lactam-sulfon	127
7.3.7	Hochspannungs-Papierelektrophorese von "X"	128
7.3.8	Proteinhydrolyse mit H ₂ SO ₄	128
7.3.9	Bildungsbedingungen für SCMC-Lactam-sulfon	128
7.3.10	Decarboxylierung von SCMC-Sulfon	129
7.3.11	Pyruvatbestimmung nach HCl-Behandlung von SCMC- Sulfon	129
7.4	Versuchsbeschreibungen zu Kap.4	129
7.4.1	Tryptische Spaltung	129
7.4.2	Säulenchromatographie	130
7.4.2.1	Allgemeines Verfahren	130
7.4.2.2	Gelfiltration an Sephadex G-50	130
7.4.2.3	Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sephadex	130
7.4.3	Behandlung von T _A mit DTT	131

7.4.4	Chymotrypsin-Verdauung	131
7.4.5	Hochspannungs-Papierelektrophorese in MICHL-Tanks .	131
7.4.6	^{14}C -Acetyl-Beladung der Synthetase und Untersuchung tryptischer ^{14}C -Acetyl-Peptide	132
7.4.6.1	Beladung	132
7.4.6.2	Trypsin-Spaltung der ^{14}C -Acetyl-Synthetase . . .	132
7.4.6.3	Säulenchromatographische Reinigung von Acetyl- T_B .	133
7.4.6.4	Hochspannungs-papierelektrophorese von $\text{Ac-T}_\text{B}^{\text{D}_2}$.	133
7.4.6.5	Papierchromatographie von $\text{Ac-T}_\text{B}^{\text{D}_2}\text{B}$	133
7.4.7	Präparative Reinigung von T_B	134
7.4.7.1	^{14}C -CAM-Beladung	134
7.4.7.2	Tryptische Spaltung	134
7.4.7.3	Säulenchromatographie von T_A	134
7.4.7.4	Tryptische Nachspaltung von T_A	134
7.4.7.5	Säulenchromatographie von T_B	135
7.4.8	Endgruppenbestimmung mit Dansylchlorid	135
7.4.9	Sequenzanalyse	135
7.4.10	Identifizierung von PTH-Aminosäuren	136
7.4.11	Reduktive Hydrolyse der PTH-Aminosäuren	137
7.4.12	Behandlung von T_B mit Pyrrolidonyl-Peptidase . . .	137
7.5	Versuchsbeschreibungen zu Kap.5	138
7.5.1	Beladung der Mutanten-Enzyme mit ^{14}C -CAM-Resten und tryptische Spaltung	138
7.5.2	Test auf "Half-site-Reaktivität" der Synthetase .	138
7.6	Versuchsbeschreibungen zu Kap.6	140
7.6.1	MalonylCoA-Decarboxylase-Test (Methode a) . . .	140
7.6.2	MalonylCoA-Decarboxylase-Test (Methode b) . . .	140
8	Zusammenfassung	141
9	Literaturverzeichnis	143
	Lebenslauf	

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACP	Acyl Carrier Protein
^{14}C , *	Kohlenstoffisotop 14
CAM-	Carboxamidomethyl- (= $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CH}_2-$)
CAM-Synthetase	carboxamidomethylierte Fettsäuresynthetase
Ci	Curie
CM-	Carboxymethyl- (= $\text{HOOC}-\text{CH}_2-$)
CoA, CoASH	Coenzym A
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
Dansyl	Dimethylamino-naphthalin-sulfonyl
DCC	Diphenylcarbamoylchlorid
DEAE	Diäthylaminoäthyl
Dec	Malonyl-Decarboxylase
DNP-	Dinitrophenyl-
dpm	Desintegrationen pro Minute
DPTU	Diphenyl-thioharnstoff
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
E, mE	Enzym-einheit, -millieinheit
ΔE_x nm	Extinktionsänderung bei x nm
EDTA	Äthylendiamin-tetraacetat
FMN	Flavinmononucleotid
FSS, Synthetase	Fettsäuresynthetase (aus Hefe)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden
IAA	Jodessigsäure ⁺
IAM	Jodacetamid ⁺
k	Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion
K_m	Michaelis-Konstante
K-PO_4	Kalium-Phosphat-Puffer (angegebene Molarität gilt für Phosphat)
min	Minuten
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxydiert
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert

⁺In Übereinstimmung mit der angelsächsischen Nomenklatur (77) wurde für Jodacetamid die Abkürzung "IAM" zur Unterscheidung von Jodessigsäure (IAA) gewählt.

NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, ox.
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, red.
NEM	N-Äthyl-maleinimid
PAS	Perameisensäure
pI	Isoelektrischer Punkt
PTH-	Phenylthiohydantoin-
Pyridin-Acetat	Pyridin-Acetat-Puffer (angegebene Molarität gilt für Acetat)
SCAMC	D-Carboxamidomethyl-cystein
SCMC	S-Carboxymethyl-cystein
SDS	Natrium-dodecylsulfat
sec	Sekunden
T _{A,B}	Tryptische Peptide A,B
TCE	Trichloressigsäure
TPCK	N-Tosyl-L-phenylalanyl-chlormethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan - HCl-Puffer (angegebene Molarität gilt für Tris)
V	Volumen
V _o	äußeres Volumen einer Gelpackung
V _t	Gesamtvolumen einer Säule
[] _{o,t}	Konzentration zur Zeit o bzw. t

1

Einleitung

1.1 Sulfhydrylgruppen in Proteinen

Im Jahre 1925 zeigten SCHWARTZ und OSCHMANN, daß die Glykolyse im Muskel durch Jodessigsäure gehemmt wird (1); dieses Resultat wurde einige Jahre später von LUNDGAARD bestätigt, der zudem bewies, daß auch die alkoholische Gärung in Hefe unterbunden wird (2-4). In der Folge wurde gefunden, daß zahlreiche enzym-katalysierte Vorgänge durch Substanzen wie N-Äthyl-maleinimid, Jodacetat oder p-Chlor-mercuribenzoat gehemmt werden können. Derartige Reagentien, die mit Sulfhydrylgruppen reagieren und dadurch enzymatische oder metabolische Prozesse beeinflussen können, werden im allgemeinen als "Sulfhydryl-Reagentien" (SH-Reagentien) bezeichnet (5).

Konzentrierte sich das Interesse anfangs vor allem auf mögliche Wirkungen von SH-Reagentien auf niedermolekulare Thiole wie insbesondere das Glutathion (6), so stellte man später fest, daß SH-Gruppen von Enzymen viel wichtigere Angriffspunkte darstellen. Wegen ihrer Bedeutung für enzymatische Vorgänge, aber auch wegen der Vielzahl der verfügbaren Untersuchungsmethoden wurde die Rolle von Protein-Thiolgruppen eingehend studiert und mehrfach zusammenfassend dargestellt (7-14). Man erkannte, daß SH-Gruppen in verschiedener Weise für Struktur und Funktion der Proteine bedeutsam sein können:

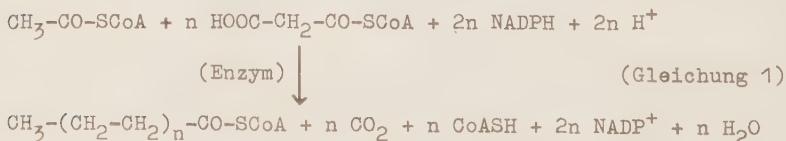
- Thiolgruppen können durch Ausbildung von Disulfidbindungen, aber auch von Wasserstoff-Brückenbindungen zur Aufrechterhaltung von Raumstruktur und Aggregationszustand der Polypeptide beitragen (15);
- Thiolgruppen können an der Bindung von prosthetischen Gruppen (z.B. des Häms im Cytochrom c (16) oder des Flavins in der Monoamin-oxidase (17)) oder Metallionen (z.B. des Eisens in Nicht-Häm-Eisen-Proteinen (18)) beteiligt sein;
- Thiolgruppen können direkt am katalytischen Prozess beteiligt sein. Anfangs führte man diese mögliche Beteiligung von Mercapto-

gruppen hauptsächlich auf den Redox-Übergang zwischen Thiol und Disulfid zurück. Nach der Aufklärung der chemischen Struktur der "aktivierten Essigsäure" durch LYNEN-(19) jedoch trat die als entscheidendes funktionelles Strukturelement des AcetylCoA erkannte Thioester-Bindung in den Mittelpunkt des Interesses. Ihre besondere Stellung ist darauf zurückzuführen, daß es sich um eine "energiereiche Bindung" (20) handelt, die jedoch kinetisch im wässrigen Medium bei neutralem pH und physiologischen Temperaturen völlig stabil ist (21); ihre latente hohe Reaktivität kann nur unter vollständiger enzymatischer Kontrolle realisiert werden.

Während noch 1959 bei keinem einzigen Enzym die direkte Beteiligung von Protein-Thiolgruppen am katalytischen Prozess eindeutig nachgewiesen war (8), kennt man heute eine ganze Reihe von Enzymen, an deren Wirkungsmechanismus Protein-SH-Gruppen durch intermediäre Bildung von Thioesterbindungen teilnehmen: Papain (22), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (23), die α -Ketosäure-Dehydrogenasen (24), Citrat-Lyase (25), Gramacidin S-Synthetase (26), Bacitracin-Synthetase (27), Thiolase (28) sowie die fettsäuren-synthetisierenden Enzymsysteme.

1.2 Fettsäuresynthetase

Aus zahlreichen Organismen wurden Enzymsysteme isoliert, die die de novo-Biosynthese gesättigter Fettsäuren aus AcetylCoA und MalonylCoA gemäß (Gleichung 1) katalysieren (Übersichten: 29-32).



Produkte der Synthese sind in Hefe Palmitoyl- und StearoylCoA ($n = 7$ oder 8), im tierischen Gewebe und in Pflanzen hingegen die freien Fettsäuren (33-35).

Bei der im Laboratorium von LYNEN durchgeführten Untersuchung der Fettsäuresynthese in Hefe gelang es, einen stabilen Multienzymkomplex zu isolieren, der in der Lage ist, den gesamten Syntheseprozess gemäß (Gleichung 1) zu katalysieren (36-38). Dieser als "Fettsäuresynthetase" bezeichnete Komplex ist Bestandteil des cytoplasmatischen Raumes (39,40) und besitzt ein Molekulargewicht von $2,3 \cdot 10^6$ Dalton (41-43). Er konnte in reiner Form gewonnen und (als erster Multienzymkomplex) kristallisiert werden (44). Auch aus anderen Pilzen (45,46) sowie aus Tieren (47-51) wurden Multienzymkomplexe der Fettsäuresynthese isoliert, während in Bakterien (52) und Pflanzen (53) die Teilreaktionen des Syntheseprozesses durch Einzelenzyme katalysiert werden, die bei konventionellen Protein-Fraktionierungsmethoden getrennt erhalten werden.

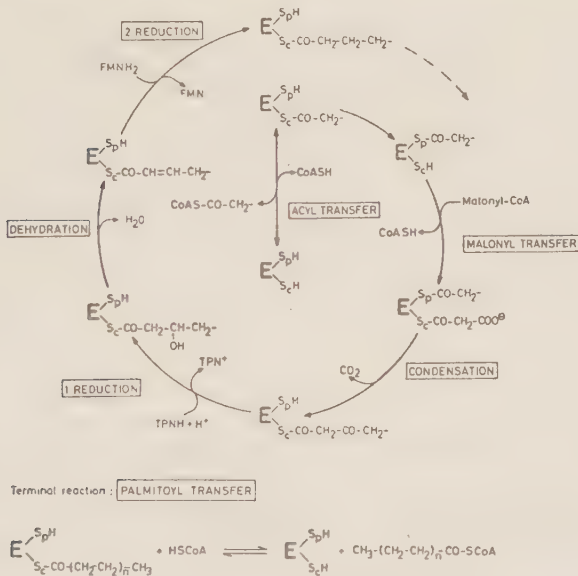


Abb. 1 Reaktionsschema der Fettsäuresynthese nach LYNEN (56)

Mit Hilfe von Substratmodellen war es LYNEN möglich, die einzelnen Teilschritte der Synthese aufzuklären (37,54). Bei sämtlichen Reaktionen sind Substrate und Zwischenprodukte als Thioester kovalent an den Multienzymkomplex gebunden; erst die Endprodukte

Palmitin- und Stearinsäure werden auf Coenzym A rückübertragen (38). Das Reaktionsschema der Fettsäuresynthese ist in Abb.1 dargestellt. Es wurde in korrekter Form erstmals von LYNEN vorgeschlagen (37,41,55); seither hat sich gezeigt, daß die Teilschritte - mit Ausnahme der Abschlußreaktion - in allen untersuchten Organismen die gleichen sind.

Wie Abb.1 zeigt, sind am Syntheseprozess zwei SH-Gruppen der Fettsäuresynthetase beteiligt; sie wurden von LYNEN als "zentrale" und "periphere" SH-Gruppe bezeichnet (41). Die Substrate Acetat und Malonat werden vom Coenzym A über Transferase-Komponenten des Multienzymkomplexes auf die zentrale SH-Gruppe übertragen; diese Thiolgruppe ist Bestandteil eines als "Acyl Carrier Protein" (ACP) (57) bezeichneten Strukturelements der Synthetase und dient als Bindungsstelle für alle Zwischenprodukte des Syntheseprozesses.

Die periphere SH-Gruppe befindet sich im aktiven Zentrum des kondensierenden Teilenzym (β-Ketoacyl-ACP-synthetase). Sie übernimmt den Acetylrest sowie die im Verlauf der Synthese gebildeten gesättigten Acylreste als Thioester; anschließend erfolgt - als kettenverlängernder Schritt und somit Kernstück der Fettsäuresynthese - die Kondensation der gesättigten Acylreste mit ACP-gebundenem Malonat, die durch die gleichzeitige (58,59) Abspaltung von CO₂ thermodynamisch gegenüber der Verknüpfung zweier Acetylreste stark begünstigt ist (60,61). Die Rolle der peripheren SH-Gruppe ist in Abb.2 schematisch wiedergegeben.

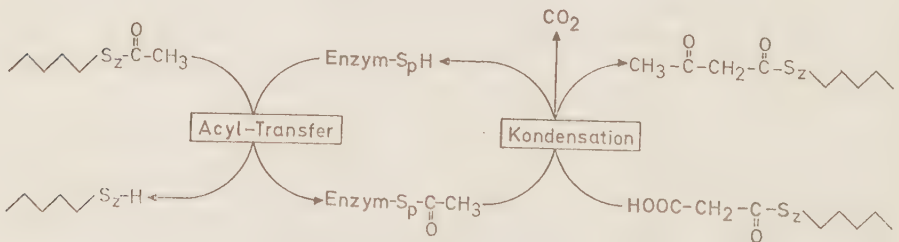


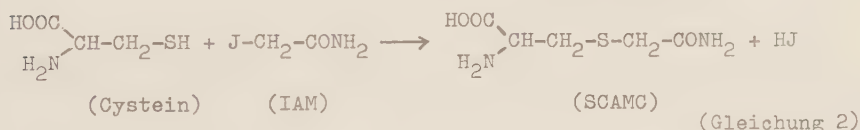
Abb.2 Funktion der peripheren SH-Gruppe

Spätere Untersuchungen an den Enzymsystemen aus Hefe (62,63) und E.coli (64) ergaben, daß die beiden, zunächst auf Grund ihrer Funktion im katalytischen Prozess voneinander unterschiedenen

Thiolgruppen auch chemisch verschieden sind: während die periphere SH-Gruppe zu einem Cysteinrest des Enzyms gehört, ist die zentrale SH-Gruppe Bestandteil eines Cysteaminrests. Dieser ist Baustein einer 4'-Phosphopantetheingruppierung, die über einen Serinrest an das Protein gebunden ist. Der hierdurch gebildete "Schwingarm" von 20 Å Länge (65) ermöglicht den Transport der daran gebundenen Intermediate von einem Teilenzym zum nächsten (66).

1.3 Fettsäuresynthetase und Jodacetamid

Schon in den ersten Veröffentlichungen über Hefe-Fettsäuresynthetase wurde über die Hemmung des Enzyms durch eine Reihe von SH-Reagentien berichtet (36,37). Eingehendere Untersuchungen über die Wirkung von Jodacetamid (IAM) wurden von SCHWEIZER (67), HAGEN (68) und OESTERHEIT (61) durchgeführt. IAM reagiert mit Thiolen (z.B. Cystein) in der in (Gleichung 2) dargestellten Weise unter Bildung von S-Carboxamidomethyl-Verbindungen (z.B. S-Carboxamidomethyl-cystein, SCAMC), kann jedoch auch mit anderen Aminosäureseitenketten, wie denen des Methionins (69) oder Histidins (70), in Reaktion treten.



Die Experimente SCHWEIZERS (67) ergaben, daß die Beladung der Synthetase mit Acetylresten nach IAM-Behandlung stark vermindert war; Methylmalonylreste wurden unverändert gebunden. SCHWEIZERS Annahme, IAM reagiere mit peripheren SH-Gruppen des Komplexes, wurde weiterhin durch die Arbeiten von HAGEN (68) gestützt; er fand, daß bei Inkubation des Enzyms mit ^{14}C -markiertem IAM die Synthetase-Aktivität synchron mit dem Einbau von 3 CAM-Resten in das Protein verloren ging (weiterer Einbau von Radioaktivität fand dann - bei Durchführung der Reaktion bei 0°C - nicht mehr statt). Als Produkt der Beladung isolierte er nach salzsaurer Proteinhydrolyse S-Carboxymethyl-cystein (SCMC).

Versuche OESTERHELTS (61) bestätigten einerseits auf peptid-chemischem Wege, daß IAM mit peripheren SH-Gruppen der Synthetase in Reaktion tritt, ließen die Situation jedoch komplizierter erscheinen: eine Reihe von Ergebnissen, auf die im folgenden an geeigneter Stelle eingegangen wird, veranlaßten OESTERHELT zum Postulat einer zweiten IAM-Bindungsstelle, deren Alkylierung durch IAM die Fähigkeit der Synthetase zur Bildung von Fettsäuren aus AcetylCoA und MalonylCoA unberührt lassen, dem Enzym jedoch die neue katalytische Eigenschaft einer MalonylCoA-Decarboxylase verleihen sollte. Die chemische Natur dieser zweiten Bindungsstelle konnte nicht geklärt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, durch genaue Untersuchung der Reaktion der Fettsäuresynthetase mit Jodacetamid Klarheit über Anzahl, chemische Natur und Umgebung der Carboxamidomethyl-Bindungsstellen zu gewinnen und die scheinbaren Widersprüche zwischen den von HAGEN und OESTERHELT erhaltenen Ergebnissen zu beseitigen.

2

Die Hemmung der Fettsäuresynthetase durch Jodacetamid: Kinetik und Stöchiometrie

2.1 Hemmungskinetik

Übereinstimmend mit früheren Bearbeitern fanden wir irreversible Hemmung der Fettsäuresynthetase durch IAM. Der zeitliche Verlauf der Inaktivierung durch 1 mM IAM ist in Abb.3 (Kurve I) dargestellt; Auswertung der Meßwerte nach (Gleichung 3) (61)

$$\frac{1}{[IAM]} \ln \frac{100}{x} = kt \quad (\text{Gleichung 3})$$

(x = Prozent Restaktivität zur Zeit t)

ergibt für die Reaktion zwischen Synthetase und IAM die pseudomonomolekulare Geschwindigkeitskonstante $k = 1,4 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$, in Übereinstimmung mit OESTERHEIT ($k = 1,3 \pm 0,2 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$, (61)).

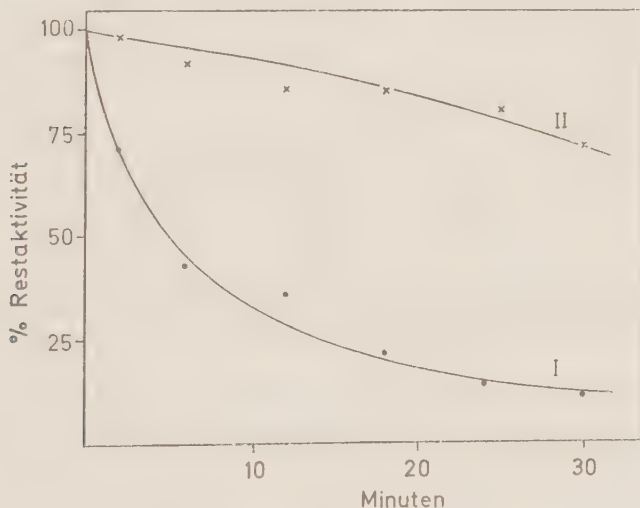


Abb.3 Inaktivierung von Fettsäuresynthetase durch 1 mM IAM
Bedingungen: 0,1 M K-PO₄, pH 6,5; 0°C. Kurve I: ohne AcetylCoA; Kurve II: Vorinkubation mit 1 mM AcetylCoA.

2.2 Durch IAM gehemmte Enzymkomponente

Seit langem ist bekannt, daß unter den Teilreaktionen der Fettsäuresynthese die Kondensationsreaktion durch SH-Reagentien wie IAM oder N-Äthyl-maleinimid (NEM) gehemmt wird (54). Untersuchungen von ZIEGENHORN (71) zeigten, daß alle anderen Teilaktivitäten des Enzyms durch Behandlung mit 10 mM IAM oder NEM nicht beeinflußt werden. Andererseits wird auch die Bildung von Triacetsäurelacton aus AcetylCoA und MalonylCoA in Abwesenheit von NADPH, eine unter Mitwirkung der peripheren SH-Gruppe ablaufende "Entgleisungsreaktion", durch IAM unterbunden (72,73).

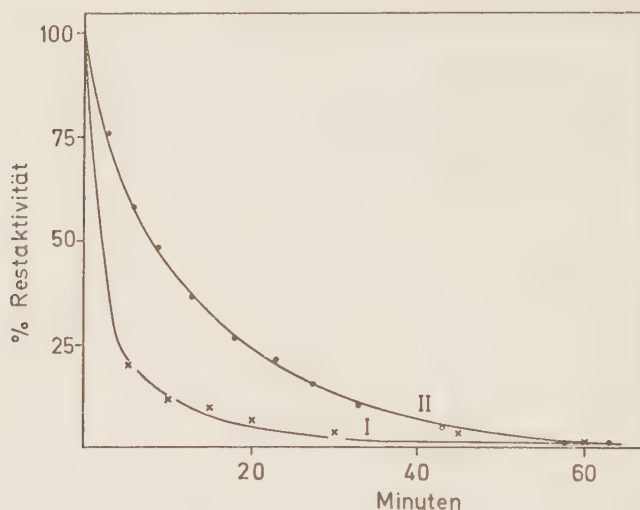
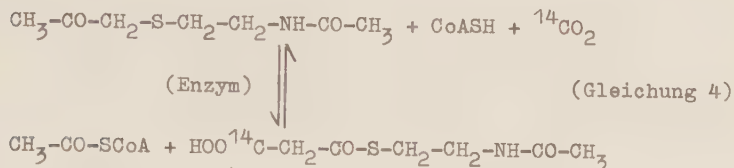


Abb.4 Hemmung von Synthetase-Gesamtreaktion (Kurve II) und Kondensationsreaktion (Kurve I) durch 0,5 mM IAM (0,1 M $K-PO_4$, pH 6,5; 0°C)

Wir versuchten, die Inhibierung der Kondensationsreaktion in ihrem zeitlichen Verlauf zu verfolgen. Abb.4 zeigt die rasche Inaktivierung der kondensierenden Enzymkomponente (Kurve I) sowie der Gesamtreaktion (Kurve II).

Zum Test der Kondensationsreaktion bedienen wir uns hierbei des auf "Spaltung unter Carboxylierung" von S-Acetoacetyl-N-acetylcysteamin beruhenden Verfahrens (43,74). In Umkehrung der

β -Ketoacyl-Synthese wird hierbei das Modellssubstrat durch $^{14}\text{CO}_2$ gespalten; Meßgröße ist die im Produkt S-Malonyl-N-acetyl-cysteamin inkorporierte, säurestabile Radioaktivität (Gleichung 4):



An der Reaktion wirken neben dem kondensierenden Teilenzym (mit der peripheren SH-Gruppe) noch die zentrale SH-Gruppe und die Acetyl-Transferase-Komponente des Enzyms mit; nicht beteiligt ist nach Versuchen von WILLECKE die Malonyl-Transferase, da das Produkt S-Malonyl-N-acetyl-cysteamin direkt entsteht und kein MalonylCoA gebildet wird (72).

Versuche von OESTERHELT (61) (deren Deutung jedoch umstritten ist, vgl. (75)) ließen den Schluß zu, daß unter den in vitro-Testbedingungen die Kondensationsreaktion der langsamste und somit für die Gesamtreaktion geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Fettsäuresynthese ist. Unerwartet erscheint daher zunächst, daß im Versuch der Abb.4 ein langsamerer Abfall der Synthetase-Gesamtaktivität gefunden wurde als für die Kondensationsreaktion. Eine naheliegende Erklärung hierfür bietet jedoch die Tatsache, daß die Gesamtreaktion hier unter Verwendung der Modellssubstrate N,S-Diacetylcysteamin und S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin anstelle von AcetylCoA und MalonylCoA getestet wurde (Standardtest B, vgl. Kap.7.1.5); es ist durchaus vorstellbar, daß unter diesen Testbedingungen eine der Transferasereaktionen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.

2.3 Schutz der Synthetase vor Inhibierung durch IAM

2.3.1 Schutz durch Acetylbeladung

Kurve II der Abb.3 zeigt (übereinstimmend mit Ergebnissen OESTERHELTS (61)), daß die Synthetase durch Vorinkubation mit AcetylCoA gegen IAM geschützt werden kann. Auch das Modellsubstrat N,S-Diacetylcysteamin (65,76), dessen als Thioester gebundener Acetylrest wie derjenige des AcetylCoA auf das Enzym übertragen werden kann (43), schützt vor dem Angriff des Hemmstoffs; Vorbehandlung der Synthetase mit MalonylCoA oder dem Modellsubstrat S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin hingegen verhindert die Inaktivierung nicht (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1 Schutz der Fettsäuresynthetase gegen IAM-Hemmung

Das Enzym wurde in 0,1 M K-PO₄, pH 6,5, mit den angegebenen Substraten bei 0°C für 5 min vorinkubiert. Dann wurde IAM zugegeben (Endkonzentration 5 mM) und nach 20 min die Enzymaktivität bestimmt.

Vorinkubation	% Restaktivität
ohne (Kontrolle)	≤ 1,2
0,55 mM AcetylCoA	92
0,6 mM N,S-Diacetyl-cysteamin	68
0,6 mM MalonylCoA	0,9
0,6 mM S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin	0,3

Das Ergebnis ist vereinbar mit der Annahme, daß IAM mit peripheren SH-Gruppen des Enzyms reagiert (diese sind ja Acetyl-Bindungsstellen!). Denkbar wäre aber auch (vgl. 8,77), daß der Angriff des Hemmstoffs auf eine vom peripheren Thiol unterschiedene Gruppe der Synthetase durch den enzymgebundenen Acetylrest sterisch behindert oder durch eine substrat-induzierte Konformationsänderung unmöglich gemacht wird. Reaktion des IAM mit der zentralen SH-Gruppe ist als für die Inaktivierung geschwindigkeitsbestimmender Schritt wegen des fehlenden Malonyl-Schutzes auszuschließen.

2.3.2 Schutz durch Thiole ("Stopplösungen")

In früheren Arbeiten (61,71) waren zur Beendigung der Reaktion zwischen Synthetase und SH-Reagentien meist "Stopplösungen" verwendet worden, die Thiole (z.B. Cystein) im Überschuß gegenüber dem Hemmstoff enthielten. Im Verlauf unserer Versuche zeigte sich, daß das Enzym auch durch einen großen Cystein-Überschuß nur unzureichend gegen IAM geschützt werden kann; 2-Mercapto-äthanol schützt wirkungsvoller vor dem Angriff des Hemmstoffs (vgl. Tabelle 2).

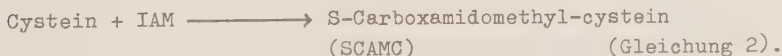
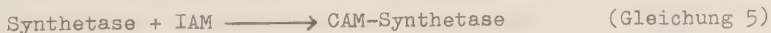
Tabelle 2 Inaktivierung der Synthetase durch IAM in Gegenwart von Thiolen

Das Enzym (0,84 mg/ml) wurde in 0,1 M K-PO₄, pH 6,5, bei 0°C in Gegenwart der angegebenen Thiolkonzentrationen mit 1 mM IAM inkubiert. Nach 15 Minuten wurde die Enzymaktivität gemessen.

Thiol	% Restaktivität
ohne (Kontrolle)	33
10 mM Cystein	50
50 mM Cystein	63
100 mM Cystein	86
10 mM 2-Mercaptoäthanol	97

Es ist daher nicht verwunderlich, daß ZIEGENHORN nur unvollständigen Abfang von 10 mM IAM durch 15 mM Cystein fand (71).

Die Erklärung für den unzureichenden Abfang des Inhibitors geht in einfacher Weise aus einer kinetischen Betrachtung hervor. In der enzym-, cystein- und IAM-haltigen Inkubationsmischung laufen folgende zwei Konkurrenzreaktionen simultan ab:



Für die Bildung der Produkte gelten folgende Beziehungen:

$$\frac{d [\text{CAM-FSS}]}{dt} = k [\text{IAM}] [\text{FSS}] \cdot 3 \quad (\text{Gleichung 6})$$

$$\frac{d [\text{SCAMG}]}{dt} = k' [\text{IAM}] [\text{Cystein}] \quad (\text{Gleichung 7})$$

In (Gleichung 6) muß hierbei die Enzymkonzentration mit dem Faktor 3 multipliziert werden, da 1 Molekül Synthetase unter den vorliegenden Bedingungen mit 3 Molekeln IAM reagiert ((68) und Kap.2.4).

Betrachtet man die Anfangsphase der Reaktion, so gilt für das Konzentrationsverhältnis der entstehenden Produkte

$$\frac{d [\text{CAM-FSS}]}{d [\text{SCAMG}]} = \frac{[\text{CAM-FSS}]}{[\text{SCAMG}]} = \frac{3 k [\text{FSS}]}{k' [\text{Cystein}]} \quad (\text{Gleichung 8})$$

Die Geschwindigkeitskonstante k' der Reaktion zwischen IAM und Cystein (bei 0°C und pH 6,5) bestimmten wir zu

$$k' = 0,010 \pm 0,006 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$$

(Experimentelle Einzelheiten vgl. Kap.7.2.3); die Reaktion der Fettsäuresynthetase mit IAM läuft also unter diesen Bedingungen etwa 125x schneller ab als die Alkylierung des freien Cysteins.

Setzt man den erhaltenen Wert in (Gleichung 8) ein und nimmt man eine Enzymkonzentration von $1 \mu\text{M}$ an ($2,3 \text{ mg/ml}$; üblicherweise verwendete Synthetase-Lösungen besitzen Konzentrationen zwischen etwa $8 \mu\text{g/ml} = 3 \text{ nM}$ und etwa $100 \text{ mg/ml} = 40 \mu\text{M}$), so ergibt sich bei 10 mM Cystein:

$$\frac{[\text{CAM-FSS}]}{[\text{SCAMG}]} = \frac{1,3 \times 3 \times 10^{-6}}{0,010 \times 10^{-2}} = 0,039 \quad (\text{Gleichung 9})$$

Dieses Ergebnis bedeutet, daß 3,9% des insgesamt in Reaktion tretenden IAM mit der Synthetase reagieren kann. Da der Hemmstoff aber gegenüber dem Enzym in tausendfachem Überschuß vorliegt, ist dieser geringe Teil ausreichend, um die Synthetase langsam zu inaktivieren.

Zur Beendigung der Reaktion zwischen Fettsäuresynthetase und IAM standen uns somit folgende Methoden zur Verfügung:

a) Zusatz von überschüssigem Cystein und Erhöhung des pH-Wertes der Lösung. Bei höherem pH reagieren Thiole viel rascher mit IAM, der Abfang sollte also wirkungsvoller sein. Da jedoch auch mit entsprechend erhöhter Alkylierungsgeschwindigkeit von Cystein-

resten des Enzyms zu rechnen war und die Spezifität der Carboxamidomethylierung (vgl. Kap.2.4) möglicherweise hätte verloren gehen können, verzichteten wir auf Anwendung dieses Verfahrens; die von OESTERHELT gefundene pH-Unabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante für die IAM-Hemmung (61) sagt nichts aus über mögliche, die Enzymaktivität nicht beeinflussende Nebenreaktionen des Hemmstoffs.

b) Ausfällen des Enzyms mit Trichloressigsäure (TCE) aus der IAM-haltigen Mischung. Prinzipiell wäre es denkbar, daß Cysteinreste des denaturierten Proteins mit dem noch in der Lösung vorhandenen IAM weiterreagieren könnten; dies wurde jedoch nicht beobachtet (vgl. Kap.2.4 und 2.5). Diese Reaktion ist wohl wegen des niedrigen pH-Wertes so langsam, daß sie nicht störend ins Gewicht fällt; sie ließe sich zudem durch Fällung mit einer Mischung aus TCE und Cystein weiter unterdrücken.

c) Abtrennung des Hemmstoffs und anderer niedermolekularer Bestandteile der Lösung durch Gelfiltration an Sephadex G-25 bei 0°C (Kühlraum). Diese Methode wurde im allgemeinen bevorzugt; sie besitzt lediglich den Nachteil, daß kein exakter Zeitpunkt für die Beendigung der Reaktion zwischen IAM und Synthetase angegeben werden kann. Die Laufzeiten der Säulen betrugen je nach ihrer Größe fünf bis dreißig Minuten.

Über weitere Gründe, die die Verwendung von "Stopplösungen" als unratsam erscheinen ließen, wird in Kap.2.5 berichtet.

2.4 Zur Stöchiometrie der Reaktion von IAM mit Synthetase

In Übereinstimmung mit HAGEN (68) und OESTERHELT (61) fanden wir, daß bei 0°C und pH 6,5 nur ca. 3,3 Carboxamidomethylreste in ein Synthetasemolekül eingebaut werden; die Enzymaktivität geht hierbei verloren. Kein signifikanter Unterschied der Beladungswerte ergab sich, wenn das Enzym entweder aus der Inkubationsmischung mit Trichloressigsäure ausgefällt und gründlich gewaschen wurde oder wenn die Abtrennung von überschüssigem IAM durch Gelfiltration erfolgte. Geringere Einbauwerte bei vollständiger Hemmung wurde gefunden, wenn die Synthetase vor der IAM-Behandlung

nicht mit Thiolen (z.B. Dithiothreitol, DTT) reduziert wurde; angesichts der Oxydationsempfindlichkeit von SH-Gruppen ist dies nicht erstaunlich.

Fettsäuresynthetase enthält ca. 140 Cysteinreste pro Enzymmolekül (44). Die selektive Alkylierung von nur drei Resten durch das im allgemeinen unspezifische Reagens IAM ist deshalb zunächst verblüffend und verleitet zu der Annahme, daß den mit IAM reagierenden Gruppen eine Rolle im Katalyseprozess zuzuschreiben ist; im aktiven Zentrum von Enzymen befindliche Gruppen zeigen häufig erhöhte Reaktivität auch gegenüber unspezifischen Reagentien (78). Experimente OESTERHELTS (61) eröffnen jedoch eine andere Erklärungsmöglichkeit: er stellte fest, daß die Geschwindigkeitskonstante für die Hemmung der Synthetase durch IAM im Bereich zwischen pH 5 und pH 9 vom pH-Wert der Lösung unabhängig ist. Grundsätzlich ist jedoch bei der Reaktion von Thiolen mit IAM nur das Thiolat-Anion die reaktive Spezies, während das undissoziierte Mercaptan nicht in Reaktion tritt (79); die Reaktionsgeschwindigkeit sollte also mit steigendem pH zunehmen. OESTERHELT führte sein Ergebnis deshalb auf das Vorliegen eines "präformierten Thiol-Anions" (80,81), d.h. einer Wasserstoff-Brückenbindung zwischen der mit IAM reagierenden SH-Gruppe und einer in räumlicher Nähe befindlichen basischen Gruppe zurück (vgl. Abb.5). Der Thiol-Schwefel besitzt

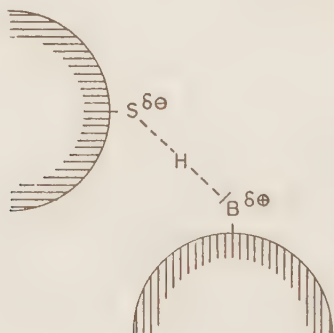


Abb.5 Schema eines "präformierten Thiol-Anions"

hierbei eine negative Partiaalladung, die vom pH der das Protein umgebenden Lösung weitgehend unabhängig sein kann. Eine solche

prädissoziierte Thiolgruppe könnte demnach bereits bei niedrigem pH mit maximaler Geschwindigkeit mit IAM reagieren.

Für die SH-Gruppe des freien Cysteins hingegen wird der Wert $pK = 8,54$ angegeben (82); wegen der Schwierigkeit, zwischen den Dissoziationskonstanten der Thiol- und Aminogruppe des Cysteins experimentell zu unterscheiden, weichen die Literaturangaben erheblich voneinander ab ($pK = 8,18$: (83); $pK = 8,33$: (84); $pK = 8,65$: (85)). Bei pH 6,5 liegen somit ca. 0,9% des Cysteins als Thiolat-Anion vor. Aus der experimentell gemessenen Geschwindigkeitskonstanten $k' = 0,010 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ für die Umsetzung des Cysteins mit IAM bei pH 6,5 und 0°C (vgl. Kap.2.3.2) läßt sich nach (Gleichung 10) die "wahre" Geschwindigkeitskonstante k berechnen, die sich auf die Reaktion des Thiolat-Anions bezieht und pH-unabhängig ist (79):

$$k = \frac{k' ([H^+] + K)}{K} = \frac{0,010 (3,2 \cdot 10^{-7} + 2,9 \cdot 10^{-9})}{2,9 \cdot 10^{-9}}$$

$$k = 1,12 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1} \quad (\text{Gleichung 10})$$

(K = Dissoziationskonstante der Cystein-SH-Gruppe)

Dieser Wert stimmt innerhalb der Fehlergrenze mit der Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion von IAM mit Fettsäuresynthetase überein ($k = 1,3 \pm 0,2 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$, vgl. Kap.2.1).

Die gute Übereinstimmung muß gewiß wegen der Unsicherheit des pK -Wertes der Cystein-Thiolgruppe als zufällig angesehen werden; zudem wäre zu berücksichtigen, daß peptidgebundenes Cystein (wegen der Abwesenheit einer positiven Ladung an der Aminogruppe) eher schneller mit IAM reagieren sollte als freies Cystein und daß die Nucleophilie eines an einer Wasserstoffbrücke beteiligten Thiolat-Schwefels geringer sein sollte als diejenige eines freien RS^- -Anions (79). In jedem Falle ist ersichtlich, daß die schnelle Reaktion der drei mit IAM reagierenden SH-Gruppen der Synthetase (und damit die "Selektivität" des Hemmstoffs) sich ohne weiteres auf das Vorliegen der Struktur eines "präformierten Thiol-Anions" zurückführen läßt. Dies muß aber durchaus nicht notwendigerweise bedeuten, daß die betreffende SH-Gruppe sich im aktiven Zentrum des Enzyms befindet oder am katalytischen Prozess beteiligt ist.

2.5 Gleichzeitigkeit von Inaktivierung und CAM-Einbau

Ergebnisse HAGENS zeigten, daß bei 0°C der Einbau von drei CAM-Resten in das Enzymprotein gleichzeitig mit dem Verlust der enzymatischen Aktivität erfolgt (68). OESTERHELT hingegen fand bei Wiederholung des Versuchs in Gegenwart von AcetylCoA einen unterschiedlichen Verlauf von CAM-Einbau und Inaktivierung: in einer schnellen Anfangsphase der Reaktion schien der Einbau von CAM-Resten von nur geringem Aktivitätsverlust begleitet zu sein. Dieses Ergebnis wurde dem Vorhandensein zweier verschiedener CAM-Bindungsstellen zugeschrieben (61).

Wie wir feststellten, ist diese scheinbare Asynchronität von CAM-Einbau und Inhibierung ein auf die Versuchsdurchführung zurückzuführender Artefakt. Wurden nach HAGEN Aliquote der Inkubationsmischung, die das Enzym, AcetylCoA und ^{14}C -IAM enthielt,

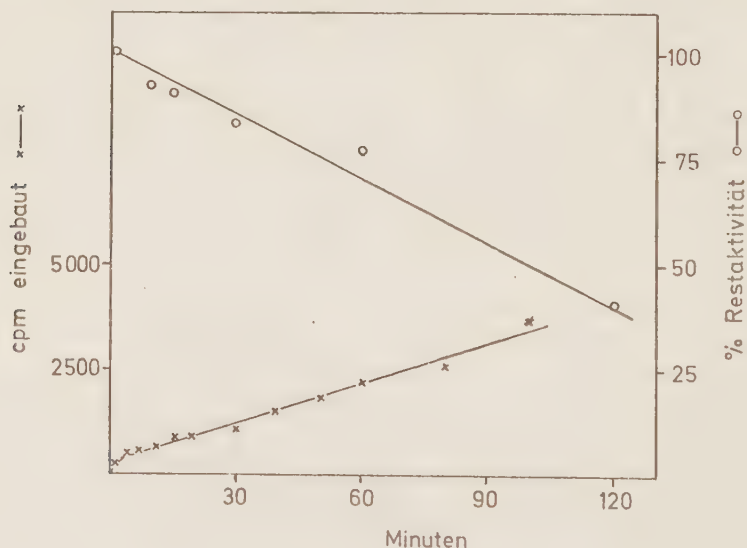


Abb.6 CAM-Einbau und Inaktivierung der Synthetase

Inkubationsansatz: Synthetase (31 mg/ml); AcetylCoA (1 mM); $[1-^{14}\text{C}]$ IAM (0,1 mM, 18,4 mCi/mMol); 0,1 M K-PO_4 , pH 6,5. Temperatur: 0°C . Zu den angegebenen Zeiten wurden je $7,8\text{ }\mu\text{g}$ Enzym im Standardtest B getestet; je 1,4 mg Protein wurden in 1 ml 0,3 M TCE pipettiert, abzentrifugiert, gewaschen, in Ameisensäure gelöst und die Radioaktivität gezählt.

direkt in 0,3 M TCE pipettiert und sodann die spezifische Beladung des gewaschenen Proteins mit ^{14}C -CAM-Resten gemessen und mit der zum Zeitpunkt des Abstoppens noch vorhandenen Restaktivität verglichen, so fanden wir kein Anzeichen für Asynchronität (vgl. Abb.6); folgten wir jedoch der Versuchsanordnung OESTERHELTS und pipettierten Aliquote der Inkubationsmischung zunächst in eine thioglykol- und serumalbumin-haltige "Stoplösung", aus der das Protein nach einigen Minuten mit TCE ausgefällt wurde, so zeigte die Einbaukurve (Abb.7) den in (61) beschriebenen "geknickten" Verlauf, der einen schnellen Einbau von Radioaktivität zu Beginn der Reaktion vortäuschte.

Wie sich herausstellte, wird in Gegenwart von Serumalbumin eine konstante Menge Radioaktivität mit dem Protein zusammen ausgefällt. Da wir nach salzsaurer Hydrolyse des Proteinniederschlags, den wir durch Zusatz von TCE zu einer Mischung aus Serumalbumin

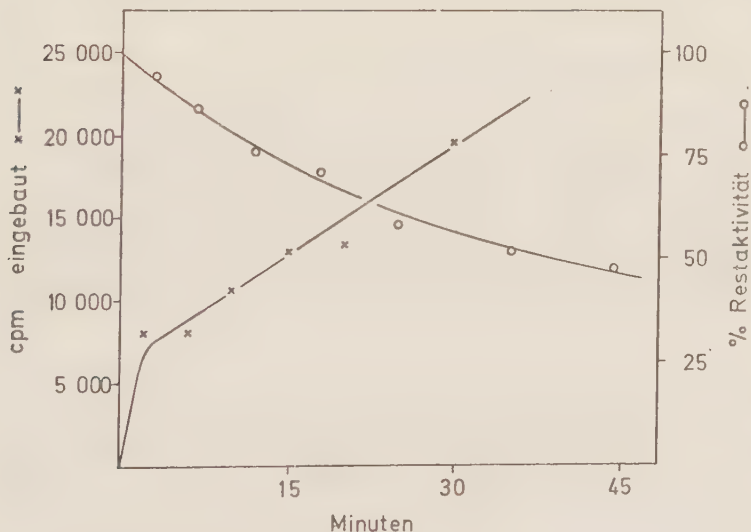


Abb.7 CAM-Einbau und Inaktivierung (mit "Stoplösung")

Inkubationsansatz: Synthetase (16,2 mg/ml); AcetylCoA (1 mM); ^{14}C -IAM (1,8 mM, 18,4 mCi/mMol); 0,1 M K-PO_4 , pH 6,5. Temperatur 0°C. Zu den angegebenen Zeiten wurden je 8,1 µg Enzym im Standardtest B getestet; je 0,81 mg Protein wurden in 1 ml "Stoplösung" (10 mM 2-Mercaptoethanol und 10 mM Serumalbumin) pipettiert, aus dieser Lösung nach einigen Minuten mit 0,3 M TCE ausgefällt und die Radioaktivität (nach einmaligem Waschen) wie in Abb.6 bestimmt.

und ^{14}C -IAM erhielten, kein ^{14}C -SCMC und nur wenig ^{14}C -SCM-Thioglykol (β -Hydroxyäthylthio-acetamid) nachweisen konnten, sondern hauptsächlich Hydrolyseprodukte des IAM fanden, nehmen wir an, daß das Serumalbumin bei seiner Denaturierung den Hemmstoff adsorbiert. Beim Ausfällen von Fettsäuresynthetase allein aus serumalbuminfreien, ^{14}C -IAM-haltigen Lösungen wird hingegen so gut wie keine nicht-kovalent gebundene Radioaktivität mitgefällt (vgl. Kap.2.4).

2.6 Wirkung anderer Hemmstoffe auf die Fettsäuresynthetase

Ergänzend zu den mit IAM durchgeführten Versuchen wurde untersucht, welche Wirkung andere SH-Reagentien auf die Synthetase ausüben.

2.6.1 Jodessigsäure (IAA)

HAGEN hatte als erster beobachtet, daß das Enzym bei Behandlung mit Jodessigsäure seine Aktivität nicht einbüßt (68). Übereinstimmend damit fanden wir keine Hemmung durch IAA bei 0°C . Bei höherer Temperatur jedoch inhibieren höhere Konzentrationen IAA die Synthetase vollständig (vgl. Tabelle 3). Auch der Multienzymkomplex Fettsäuresynthetase aus Taubenleber wird zwar durch IAM, nicht aber durch IAA gehemmt (86):

Tabelle 3 Reaktion der Fettsäuresynthetase mit Jodessigsäure

Das Enzym wurde mit den angegebenen Hemmstoffkonzentrationen für 30 min inkubiert ($0,1 \text{ M K-PO}_4$, pH 6,5); dann wurde die Restaktivität im Standardtest B gemessen.

Hemmstoff	Temperatur	% Aktivität
5 mM Jodacetamid	0°C	0,6
5 mM Jodessigsäure	0°C	99,7
100 mM Jodacetamid	30°C	0,1
100 mM Jodessigsäure	30°C	0,4

Das Fehlen der Hemmung durch Jodessigsäure bei 0°C erklärte HAGEN durch die Ähnlichkeit des Hemmstoffs mit MalonylCoA (freie Carboxylgruppe!) (68); auch der Malonylrest kann ja nicht auf die periphere SH-Gruppe übertragen werden. Tiefere Ursache hierfür dürfte wiederum das Vorliegen einer prädissoziierten Thiolgruppe sein (vgl. Kap.2.4 und 6.4): die negative Partialladung am peripheren Schwefel könnte den Angriff anionischer Reagentien erschweren. Auch IAA ist offensichtlich nicht imstande, bei 0°C die zentrale SH-Gruppe zu alkylieren.

Bei höheren Temperaturen reagieren mehr als drei Gruppen der Synthetase mit IAM (61); diese zusätzlich reagierenden Reste könnten auch in der Lage sein, mit IAA in Reaktion zu treten (unter Inaktivierung des Enzyms). Die chemische Natur dieser Gruppen untersuchten wir nicht.

2.6.2 Andere α -Halogen-carbonsäurederivate

Es war von Interesse, die Wirkung anderer, dem IAM strukturell ähnlicher Verbindungen auf die Synthetase zu untersuchen. Wir stellten fest, daß die Fettsäuresynthese nicht durch 2-Brompropionsäure unterbunden werden kann (Versuchsbedingungen: 0,1 M K-PO₄, pH 6,5; 5 mM 2-Brompropionsäure; 0°C. Synthetase-Restaktivität nach 45 min: 102%). Angesichts der fehlenden Hemmung durch Jodessigsäure ist dies nicht verwunderlich.

Gehemmt wird die Synthetase hingegen durch 2-Brompropionsäureamid. Dieses Reagens beansprucht besonderes Interesse, da es über ein asymmetrisches Kohlenstoffatom verfügt und infolgedessen in die beiden Enantiomeren getrennt werden kann; kinetische Untersuchungen mit den optisch reinen Verbindungen können möglicherweise Informationen über die sterischen Verhältnisse in der Umgebung der mit dem Hemmstoff reagierenden Gruppe liefern. Entsprechende Arbeiten wurden im Arbeitskreis von WALLENFELS am Papain durchgeführt (87).

Abbildung 8 zeigt die Inhibierung der Synthetase durch 30 mM 2-Brompropionsäureamid in normaler und semi-logarithmischer Auftragung. Messung der Inaktivierungskinetik bei verschiedenen

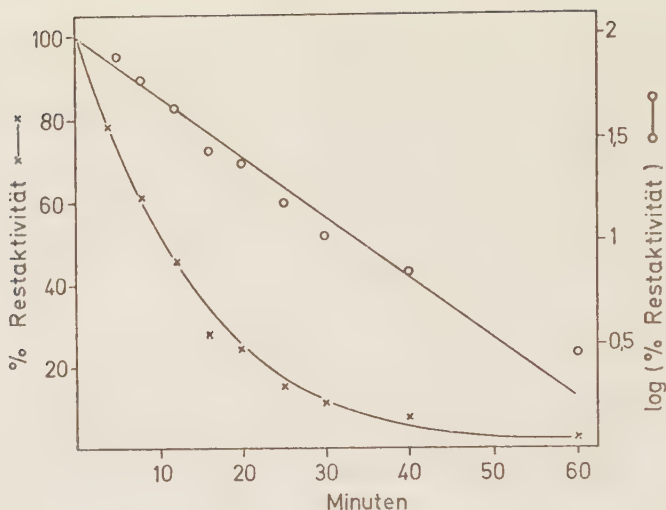


Abb. 8 Inaktivierung von Fettsäuresynthetase durch 30 mM 2-Brompropionsäureamid (0,1 M $K-PO_4$, pH 6,5; 0°C)

Hemmstoffkonzentrationen ergab, daß die Auftragung des Logarithmus der Restaktivität gegen die Zeit in allen Fällen linearen Verlauf zeigte (wie dies für eine bimolekulare Reaktion nach Gleichung 3 (Kap. 2.1) zu fordern ist) und daß die Steigung dieser Geraden, aufgetragen gegen die jeweilige Hemmstoffkonzentration, wiederum eine Gerade ergibt (Abb. 9); aus dieser erhielten wir für

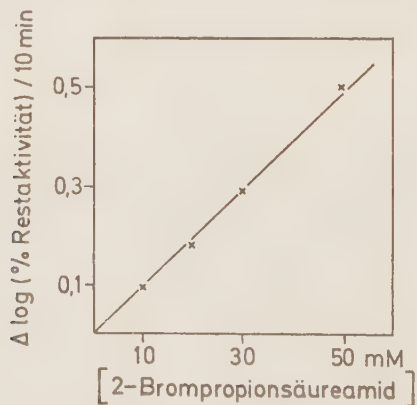


Abb. 9 Ermittlung der pseudo-monomolekularen Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion der Synthetase mit 2-Brompropionsäureamid

die Geschwindigkeitskonstante der Hemmung der Synthetase durch 2-Brompropionsäureamid den Wert $k = 0,038 \pm 0,004 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$. Die Reaktion ist also um den Faktor 35 langsamer als die Inhibierung durch IAM.

Auch vor 2-Brompropionsäureamid kann die Synthetase durch Acetyl-Beladung geschützt werden: wir fanden, daß Einwirkung von 20 mM 2-Brompropionsäureamid für 60 min bei 0°C in Gegenwart von 5 mM N,S-Diacetylcysteamin die Enzymaktivität nicht beeinträchtigt.

Ein weiterer, dem IAM strukturell ähnlicher Hemmstoff ist Bromessigsäureäthylester. In einer Konzentration von 5 mM bewirkte dieses Reagens nach 45 min Einwirkung bei 0°C auf die Synthetase einen Aktivitätsabfall auf 13% der Anfangsaktivität. Aus der Kinetik der Inaktivierung durch 2 mM Bromessigsäureäthylester berechneten wir eine Geschwindigkeitskonstante von $k = 0,04 \pm 0,01 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$, etwa übereinstimmend mit dem für die Hemmung durch 2-Brompropionsäureamid gefundenen Wert.

2.6.3 N-Äthyl-maleinimid (NEM)

In Bestätigung früherer Arbeiten (33,61,67) fanden wir, daß auch NEM die Synthetase inhibiert; das Enzym kann weitgehend durch Vorbehandlung mit AcetylCoA, nicht aber mit MalonylCoA geschützt werden (Tabelle 4). Gemeinsame Vorinkubation mit AcetylCoA und

Tabelle 4 Hemmung der Fettsäuresynthetase durch NEM

Das Enzym wurde in $0,1 \text{ M K-PO}_4$, pH 6,5, mit den angegebenen Substraten bei 0°C für 5 min vorinkubiert. Dann wurde NEM zugegeben (Endkonzentration 5 mM) und nach 30 min die Enzymaktivität bestimmt.

Vorinkubation	% Restaktivität
ohne (Kontrolle)	0,9
0,85 mM AcetylCoA	52
0,6 mM MalonylCoA	1,2
0,85 mM AcetylCoA + 0,6 mM MalonylCoA	20

MalonylCoA schützt weniger als AcetylCoA allein (wohl wegen Acetoacetyl-Bildung).

Nach Ergebnissen von ZIEGENHORN (71) bleiben auch bei NEM-Behandlung alle Teilaktivitäten der Synthetase intakt; die Kondensationsreaktion wurde nicht getestet. OESTERHELT fand, daß - im Gegensatz zur Inhibierung durch IAM - die Geschwindigkeit der NEM-Hemmung pH-abhängig ist (61); auch bei der Reaktion von Thiolen mit NEM ist nur das Thiolat-Anion, nicht das undissoziierte Thiol die reaktive Spezies (88). OESTERHELT zog demgemäß den Schluß, daß NEM im für die Hemmung geschwindigkeitsbestimmenden Schritt mit einer anderen Thiolgruppe der Synthetase reagiert als IAM. Seine Annahme, es handele sich hierbei um die zentrale SH-Gruppe des Komplexes, steht im Einklang mit Ergebnissen SCHWEIZERS (63): dieser fand, daß Behandlung der Synthetase mit NEM die Beladung der zentralen SH-Gruppe mit dem Malonylrest verhindert. Andererseits ist dann das Fehlen eines Substratschutzes durch MalonylCoA nicht recht verständlich. - Eine nähere Untersuchung der NEM-Bindungsstellen wäre mit Hilfe von radioaktivem NEM auf ähnlichem Wege wie in Kap.3 beschrieben möglich.

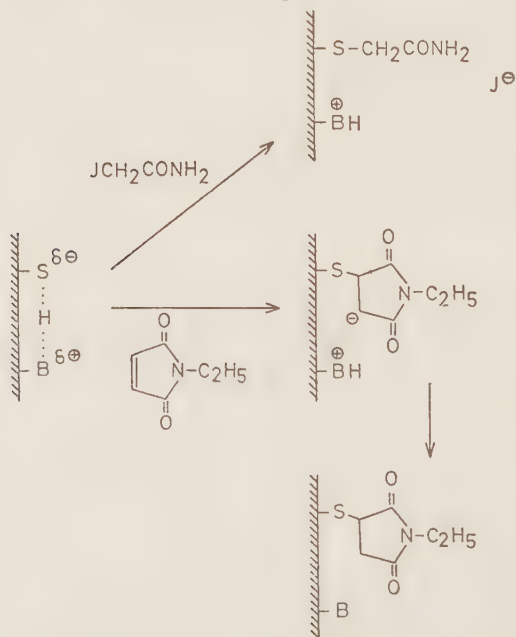


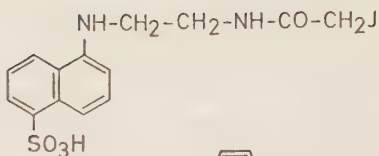
Abb.10 Schema der Reaktion eines Thiols mit IAM und NEM

Frühere Untersuchungen (89) zeigten ferner, daß NEM nicht die Eigenschaft des IAM teilt, unter geeigneten Bedingungen in spezifischer Weise mit nur wenigen Bindungsstellen der Synthetase zu reagieren. Es ist durchaus erklärlich, daß sich die Sonderstellung der drei IAM-sensitiven Bindungsstellen bei Behandlung des Enzyms mit NEM nicht zeigt (vgl. Abbildung 10): während bei Carboxamidomethylierung mit IAM das sehr schwach basische Jodid-Ion die austretende Gruppe darstellt und das formal freigesetzte Proton an der ursprünglich mit der Sulfhydrylgruppe in Wechselwirkung stehenden basischen Gruppe gebunden bleiben kann, muß bei Reaktion mit NEM das Proton auf die anionische Zwischenstufe rückübertragen werden. Es ist einsichtig, daß beide Reaktionen durch Nachbargruppen in ganz unterschiedlicher Weise beeinflußt werden können; ein ähnliches Beispiel hierfür wurde beim Studium des Ficins gefunden (81).

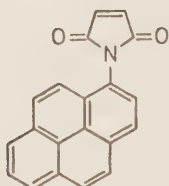
2.6.4 Fluoreszenz-markierende Reagentien

Großes Interesse erregen neuerdings Reagentien, die - ohne selbst zu fluoreszieren - die Fähigkeit besitzen, in spezifischer Weise mit Proteinen zu reagieren und hierbei fluoreszierende Produkte zu liefern. Derartige "fluorigene" Reagentien ("fluorescent probes") ermöglichen sehr empfindliche Untersuchungen über die Stöchiometrie ihrer Reaktion mit dem Protein und über die Umgebung ihrer Bindungsstellen (90-92).

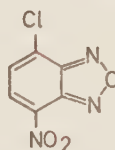
Tabelle 5 zeigt die Wirkung dreier Fluoreszenzreagentien auf die Synthetase. Wir verwendeten das IAM-Analogon N-(Jodacetyl-aminoäthyl)-5-naphthylamin-1-sulfonsäure (1,5-I-AEDANS (93), Formel I), das NEM-Analogon N-(1-pyrenyl)-maleinimid (Formel II) sowie 7-Chlor-4-nitrobenzo-furazan (NBD-Chlorid, Formel III), das je nach den gewählten Bedingungen mit Amino- oder Sulfhydrylgruppen zu reagieren vermag (94,95). Auch gegen diesen Hemmstoff wird die Synthetase durch AcetylCoA, nicht aber durch MalonylCoA geschützt.



(I)



(II)



(III)

Tabelle 5 Wirkung von fluoreszenz-markierenden Reagentien auf Fettsäuresynthetase

Das Enzym wurde in 0,1 M K-PO₄, pH 6,5, bei 0°C mit den angegebenen Reagentien behandelt; nach den angegebenen Zeiten wurde die Enzymaktivität bestimmt (Standardtest B).

Reagens	t (min)	% Restaktivität
0,43 mM 1,5-I-AEDANS (I)	260	14
1 mM N-(1-Pyrenyl-)maleinimid (II)	90	1,9
1 mM NBD-Chlorid (III)		
ohne Vorinkubation	45	30
	90	18
Vorinkubation mit		
1 mM AcetylCoA	45	92
1 mM MalonylCoA	45	29

Untersuchungen zur Fluoreszenz der Produkte konnten bisher nicht durchgeführt werden.

2.6.5 Weitere Hemmstoffe

Über Inaktivierung der Fettsäuresynthetase durch Arsenit, p-Chlor-mercuribenzoat (33) und 5,5'-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure) (Ellmans Reagens, DTNB)(61) wurde berichtet; auch Bromacetamid hemmt die Synthetase (96). Eine Übersicht über die von uns gefundenen Effekte anderer Reagentien gibt Tabelle 6.

Tabelle 6 Wirkung verschiedener Reagentien auf Fettsäuresynthetase

Das Enzym (1 mg/ml in 0,1 M $K-PO_4$, pH 6,5) wurde bei 0°C für 45 min mit den angegebenen Reagentien (Konzentration jeweils 5 mM) inkubiert und nach dieser Zeit die Restaktivität gemessen.

Reagens	% Restaktivität
Jodacetamid (Vergleich)	1,6
Acetamid	108
Chlormethyl-phenyl-keton	3,8
Trichloracetonitril	6,8
2-Chlor-äthanol	12
Acrolein	18
3-Brom-propionsäure	105
Zimtsäure	108
N-(4-Dimethylamino-3,5-dinitrophenyl)- maleinimid	12
Phenylmethansulfonylfluorid	107

Auch durch den Serin-Inhibitor Diisopropyl-fluorophosphat wird das Enzym inaktiviert (61); im Gegensatz hierzu führt Behandlung mit Phenylmethansulfonylfluorid (ebenfalls einem Serin-Reagens) nicht zum Aktivitätsverlust, wie wir in Übereinstimmung mit WEITHMANN (43) und SCHWEIZER (97) feststellten.

2.7 Wirkung von N-Acetyl-cysteamin auf die Kinetik der Fettsäuresynthese mit Modellsubstraten

Bei Bestimmung der Enzymaktivität im Standardtest B, d.h. unter Verwendung der Modellsubstrate N,S-Diacetylcysteamin und

S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin (65,76), beobachteten wir häufig nichtlinearen Verlauf des Tests, wenn Enzympräparate mit niedriger spezifischer Aktivität verwendet wurden: vor Beginn der zeitlich linearen Extinktionsabnahme lag eine Verzögerungsphase von zwei bis fünf Minuten Dauer (Abb.11, Kurve I). Die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion nimmt offenbar im Verlauf des Tests zu. Man kann vermuten, daß die Fettsäuresynthese in dieser Anfangsphase durch die Menge des vorhandenen N-Acyl-cysteamins kontrolliert wird: pro Mol entstandenes Palmitat werden aus den Modellsubstraten 1 Mol N-Acetyl-cysteamin und 7 Mol N-Capryloyl-cysteamin gebildet; 1 Mol N-Acyl-cysteamin wird als Akzeptor für den Palmitoylrest benötigt (wenn dieser nicht übertragen werden kann, kommt die Synthese zum Erliegen: (43)). Mit zunehmender N-Acyl-cysteamin-Konzentration steigt daher die Geschwindigkeit des möglicherweise zunächst langsamsten Schrittes, nämlich des Palmitoyl-Transfers, und damit der Gesamtsynthese im Verlauf des Tests an. Tatsächlich erzielten wir eine Begradigung der Kinetik, wenn dem Testansatz 0,5 mM N-Acetyl-cysteamin zugesetzt wurden (Abb.11, Kurve II).

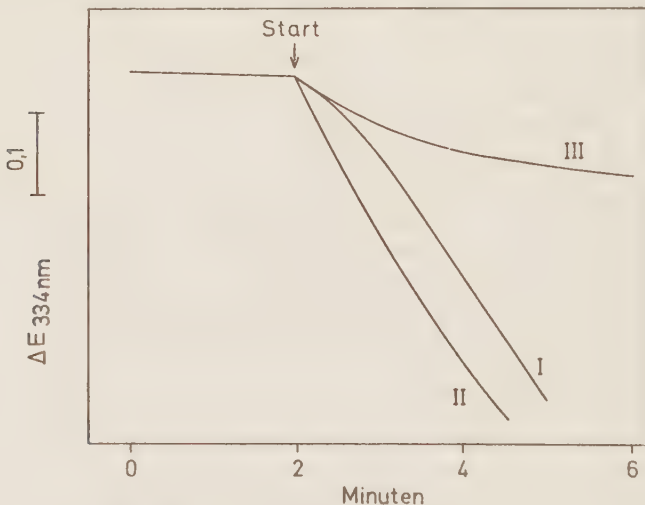


Abb.11 Synthetase-Test mit Modellsubstraten

Standardtest B; Enzym: 602 mE/mg. Kurve I: 0,8 mM N,S-Diacetylcysteamin, Start mit 0,16 mM S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin; Kurve II: wie I, zusätzlich 0,5 mM N-Acetyl-cysteamin; Kurve III: wie I, zusätzlich 5 mM N-Acetyl-cysteamin

Der nichtlineare Verlauf des Tests wurde nicht bei Enzympräparaten mit höherer spezifischen Aktivität gefunden, sowie auch dann nicht, wenn zum Test AcetylCoA und MalonylCoA oder ein Modellsubstrat und ein CoA-Thioester verwendet wurden. Dies ist erklärbar unter der Annahme, daß die Synthetase zwar Acetyl- und Malonyl-Reste von den in hoher Konzentration vorliegenden Modells substraten mit maximaler Geschwindigkeit übernehmen kann, daß die Affinität zum freien N-Acyl-cysteamin aber viel geringer ist als diejenige zum Coenzym A: während beim Test mit AcetylCoA und MalonylCoA schon sehr kleine CoA-Konzentrationen zur Sättigung der Palmitoyl-Transferase-Komponente ausreichen könnten, wäre eine größere Menge N-Acyl-cysteamin erforderlich, das bei Enzymproben mit niedriger Aktivität erst innerhalb der einige Minuten dauernden Anlaufphase gebildet wird.

Höhere Konzentrationen N-Acetyl-cysteamin hemmen die Fettsäuresynthese (Abb.11, Kurve III sowie Abb.12); Ursache hierfür ist wohl die ungünstige Beeinflussung des Beladungsgleichgewichts (N-Acyl-cysteamin ist Produkt der Beladung des Enzyms mit Acetyl- bzw. Malonylresten!) in Analogie zur bekannten Hemmung durch freies Coenzym A (43,61,71).

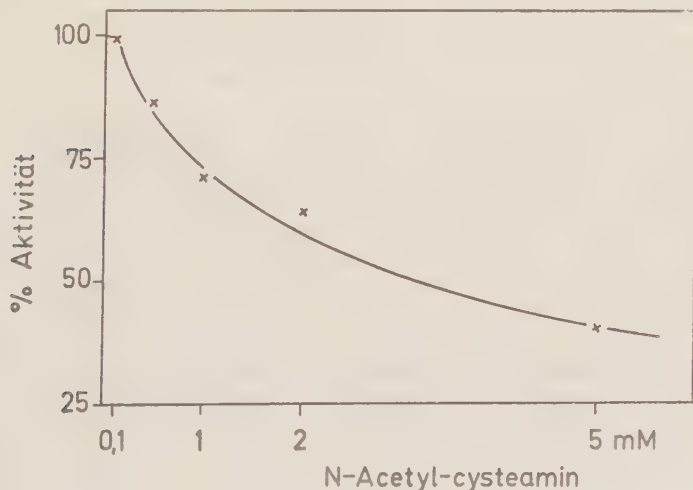


Abb.12 Hemmung der Synthetase durch N-Acetyl-cysteamin

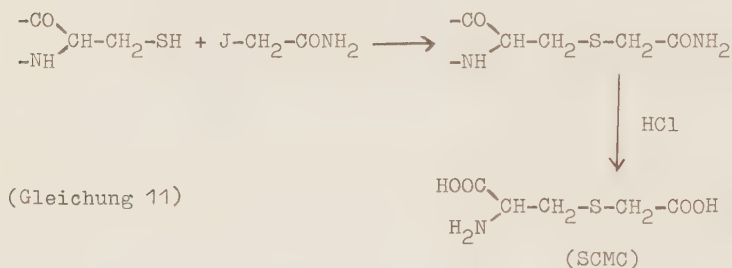
Standardtest B in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen N-Acetyl-cysteamin; Enzym (596 mE/mg).

3

Die chemische Natur der Carboxamidomethyl-Bindungsstellen der Fettsäuresynthetase

3.1 Beladung der Synthetase mit ^{14}C -IAM und salzsaure Hydrolyse

Als nächstes fragten wir nach der chemischen Natur der Gruppen des Enzyms, die bei 0°C mit IAM reagieren. HAGEN hatte gezeigt, daß nach Reaktion der Synthetase mit ^{14}C -markiertem IAM und nachfolgender Spaltung aller Peptidbindungen mit HCl ein radioaktives Produkt erhalten wird, das identisches papierchromatographisches Verhalten zeigt wie S-Carboxymethyl-cystein (SCMC) (68). SCMC erwartet man unter diesen Bedingungen als Produkt der Reaktion von IAM mit Cysteinresten des Proteins:



Die Reaktion von Cysteinresten der Synthetase mit IAM wurde von HAGEN weiterhin dadurch bewiesen, daß das mit radioaktivem IAM umgesetzte Enzym durch die Protease Pronase gespalten wurde; ein Teil der Radioaktivität im Hydrolysat verhielt sich bei der Papierchromatographie wie S-Carboxamidomethyl-cystein (SCAMC) und konnte nach Elution vom Papier mit authentischem SCAMC mit konstanter spezifischer Radioaktivität mehrmals umkristallisiert werden. Ein anderer Teil der Radioaktivität jedoch zeigte anderes papierchromatographisches Verhalten als SCAMC und konnte durch weitere Pronasebehandlung nur teilweise in SCAMC übergeführt werden; HAGEN vermutete, es handele sich um nur teilweise abgebaute Peptide, die die CAM-Bindungsstelle enthielten.

Da zudem die in HAGENS Arbeit (68) abgebildeten radioaktiven Gipfel der Papierchromatogramme häufig stark unsymmetrisches

Aussehen zeigten (möglicherweise wegen Überladung des Papiers infolge der niedrigen spezifischen Radioaktivität des eingesetzten ^{14}C -IAM), bestand die Möglichkeit, daß neben Cysteinresten noch andere Gruppen der Synthetase mit IAM reagieren könnten. OESTERHELT versuchte daher (61), durch Behandlung des salzsauren Hydrolysats von ^{14}C -CAM-Synthetase mit Perameisensäure (PAS) definierte Derivate der radioaktiv markierten Substanzen herzustellen und hierdurch einen eindeutigen Identitätsnachweis aller CAM-Bindungsstellen zu erhalten. Durch PAS werden Thioäther in Sulfone übergeführt (98):



Überraschenderweise wurde neben dem erwarteten Produkt SCMC-Sulfon noch eine weitere radioaktiv markierte Substanz erhalten, die mit keinem bekannten Reaktionsprodukt einer Aminosäure mit IAM identifiziert werden konnte.

Es bestand also die Aufgabe, zu klären, ob neben Cysteinresten noch andere Gruppen des Enzyms mit IAM in Reaktion treten und was die chemische Natur dieser weiteren IAM-Bindungsstellen bzw. der im PAS-oxydierten Hydrolysat von CAM-Synthetase auftretenden unbekannten Substanz "X" sein konnte.

In Wiederholung der von OESTERHELT angegebenen Arbeitsweise wurde Fettsäuresynthetase deshalb bei 0°C mit $[1-^{14}\text{C}]$ IAM behandelt und das carboxamidomethylierte Enzym nach Ausfällen mit TCE und Entfernung des überschüssigen radioaktiven IAM durch mehrmaliges Waschen der salzsauren Proteinhydrolyse nach MOORE und STEIN (99) unterzogen. Papierchromatographie von Proben des Hydrolysats im auch von HAGEN und OESTERHELT benutzten Laufmittelsystem Butanol-Essigsäure-Wasser (Laufmittel C, vgl. Kap.7.1.4, Tabelle 13) ergab einen einzigen symmetrischen radioaktiven Gipfel, dessen R_f -Wert (0,23) mit demjenigen von authentischem SCMC übereinstimmt (vgl. Abb.13). Insbesondere wurde kein ^{14}C -markiertes SCM-Cysteamin gefunden; Alkylierung der zentralen SH-Gruppe trat also nicht ein (R_f -Wert von SCM-Cysteamin im Laufmittel C: 0,36).

Wurde das Hydrolysat von ^{14}C -CAM-Synthetase mit PAS oxydiert und dann der Papierchromatographie unterworfen, so fanden wir (wie

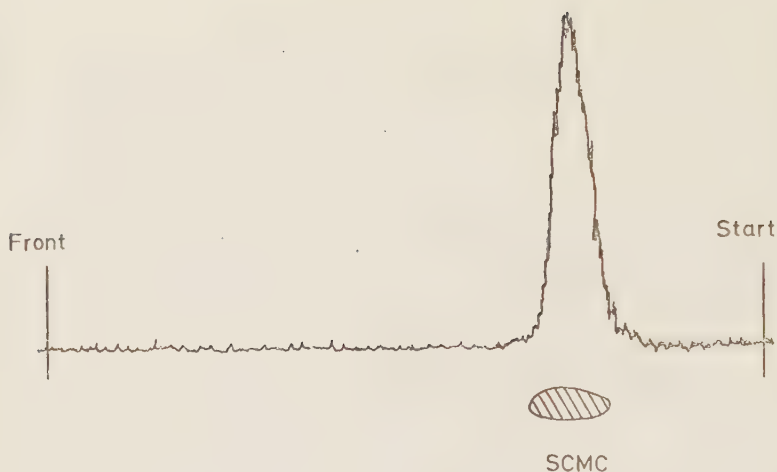
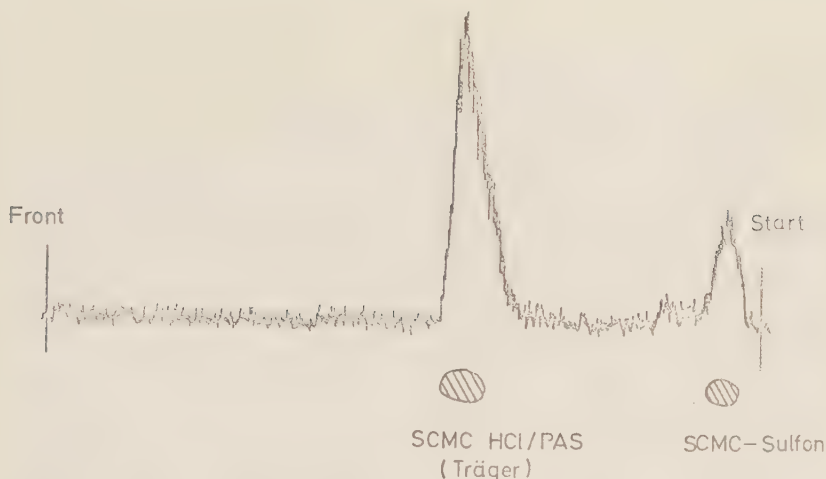


Abb.13 Radioaktivitätsverteilung im Papierchromatogramm des salzsauren Hydrolysats von ^{14}C -CAM-Synthetase

Papier:Whatman 1; Laufmittel C. Anfärbung der Referenzsubstanz mit Ninhydrin

von OESTERHELT (61) beschrieben) neben SCMC-Sulfon (R_f 0,05) eine weitere radioaktiv markierte Substanz mit R_f 0,40; PAS-Oxydation von reinem SCMC hingegen lieferte SCMC-Sulfon als einziges Produkt (Abb.14). Das Flächenverhältnis der beiden Gipfel betrug im allgemeinen SCMC-Sulfon:X = 1:2, variierte jedoch bei einigen Versuchen in unkontrollierbarer Weise. Dieses Verhältnis war unabhängig von der Höhe der spezifischen Beladung des Enzyms mit CAM-Resten (im Bereich von 0,65 bis 5,2 CAM/Synthetase-Molekül); dieser Befund machte die Annahme sehr unwahrscheinlich, daß andere Gruppen als Cysteinreste der Synthetase mit IAM in Reaktion getreten waren.

Substanz "X" war nicht identisch mit SCMC-Sulfoxid, das durch unvollständige Oxydation hätte entstanden sein können (R_f 0,03 im verwendeten Laufmittelsystem). Auch die beschriebenen Reaktionsprodukte anderer Aminosäuren (Lysin, Methionin, Histidin, Tyrosin) mit IAM schieden auf Grund der chromatographischen bzw. der von OESTERHELT gemessenen elektrophoretischen Eigenschaften von "X" aus.



Abt.14 Radioaktivitätsverteilung im Papierchromatogramm des PAS-oxydierten Hydrolysats von ^{14}C -CAM-Synthetase
Papier:Whatman 1; Laufmittel C. Anfärbung der Referenzsubstanzen
Ninhydrin (SCMC-Sulfon) bzw. Bromkresolgrün (Träger SCMC)

3.2 Identifizierung des unbekannten Produkts "X"

3.2.1 ^{14}C -CAM-Beladung von GAPDH

Die Unabhängigkeit des Produktverhältnisses SCMC-Sulfon:X im PAS-oxydierten Hydrolysat von CAM-Synthetase von der spezifischen Beladung des Enzyms mit CAM-Resten war ein starker Hinweis darauf, daß IAM nur mit Cysteinresten der Synthetase reagiert. Um dies sicherzustellen, ließen wir das SH-Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase mit $[1-^{14}\text{C}]$ IAM reagieren; hierbei treten unter den in der Literatur (100) angegebenen Bedingungen nur Cysteinreste in Reaktion. Das radioaktiv beladene Enzym unterzogen wir der salzsauren Hydrolyse und der PAS-Oxydation.

Der Einbau von ^{14}C -CAM-Resten in die Dehydrogenase war gering: wir fanden ca. 0,4 CAM-Reste pro Enzymmolekül; unter den gleichen Bedingungen maßen HARRIS und Mitarbeiter bei der Reaktion von

GAPDH mit Jodessigsäure den Einbau von 2,3 bis 2,9 CM-Resten pro Enzymmolekül (100). Der viel geringere Einbau von Radioaktivität bei Behandlung mit IAM könnte Ursache dafür sein, daß auch bei in vivo-Versuchen an Hefe ein viel geringerer Hemmeffekt von IAM auf die Fermentation gefunden wurde als für IAA (101).

Nach HCl-Behandlung und PAS-Oxydation von ^{14}C -CAM-GAPDH traten im Papierchromatogramm wie bei entsprechend behandelter Fettsäuresynthetase zwei Radioaktivitätsgipfel mit den R_F -Werten 0,05 (entsprechend SCMC-Sulfon) und 0,40 auf (vgl. Abb.15; wegen der geringen radioaktiven Beladung der GAPDH mußte eine größere Menge des Hydrolysats zur Chromatographie verwendet werden, was zu breiten Gipfeln führte).

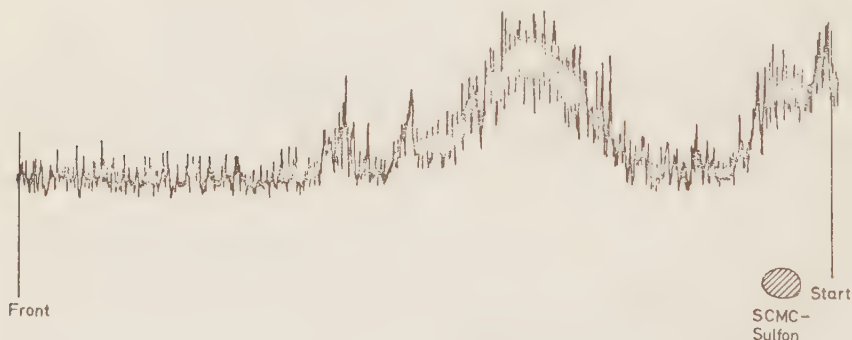


Abb.15 Radioaktivitätsverteilung im Papierchromatogramm des PAS-oxydierten Hydrolysats von ^{14}C -CAM-GAPDH

Papier:Whatman 1; Laufmittel C. Anfärbung der Referenzsubstanz mit Ninhydrin

Es war hierdurch gezeigt, daß die unbekannte Substanz "X" offensichtlich ein Produkt der Reaktion von IAM mit Cysteinresten oder nachfolgender Umwandlungen darstellen mußte. Die Bildung von "X" konnte ferner nicht auf spezifische Einflüsse der Fettsäuresynthetase zurückzuführen sein.

Zudem war hiermit bewiesen, daß IAM bei Umsetzung mit Fettsäuresynthetase bei 0°C und pH 6,5 nur Cysteinreste des Enzyms alkyliert, nicht aber Gruppen chemisch anderer Natur angreift.

3.2.2 Umwandlungsprodukte von SCMC

Substanz "X" mußte also auf noch ungeklärte Weise aus SCAMC-Resten während der Hydrolyse oder der PAS-Oxydation entstehen. Da authentisches SCMC bei Behandlung mit PAS nur SCMC-Sulfon ergab, wurde zunächst die Möglichkeit geprüft, daß während der HCl-Behandlung Veränderungen im radioaktiven Produkt stattfanden. In diesem Fall mußte das primär entstehende Umwandlungsprodukt im verwendeten papierchromatographischen System den gleichen R_f -Wert besitzen wie SCMC, bei PAS-Oxydation jedoch in ein Derivat mit R_f 0,40 übergehen.

Tabelle 7 Mögliche Umwandlungsprodukte von SCAMC

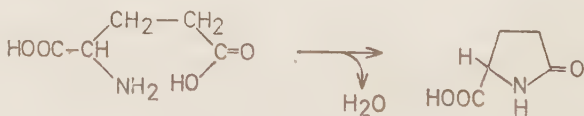
Substanz und möglicher Bildungsweg	R_f (System C)
Thiodiglykolsäure $R-SH + 2 J-CH_2^*-CONH_2 \longrightarrow R-S^+(CH_2^*-CONH_2)_2$ $\downarrow \text{HCl (69)}$ $S(CH_2^*-COOH)_2$	0,77
Thioglykolsäure $R-S-CH_2^*-CONH_2 \xrightarrow[\text{Thioäther-spaltung}]{\text{HCl/H}_2\text{O}} HS-CH_2^*-COOH + R-OH$	0,80
Glykolsäure $R-S-CH_2^*-CONH_2 \xrightarrow[\text{Thioäther-spaltung}]{\text{HCl/H}_2\text{O}} HO-CH_2^*-COOH + R-SH$	0,56
Glyoxylsäure $R-S-CH_2^*-CONH_2 \xrightarrow{\text{O}_2 \text{ (Luft)}} R-SO-CH_2^*-CONH_2$ $\downarrow \text{HCl (98)}$ $CHO-CH_2^*-COOH$	0,66

Tabelle 7 zeigt einige der von uns untersuchten Substanzen, die als Umwandlungsprodukte des SCMC auf den angegebenen Wegen denkbar gewesen wären, und ihre R_f -Werte im Laufmittelsystem G; keine dieser Verbindungen kam als Vorläufer von "X" in Frage. Dies steht im Einklang mit der Literaturangabe (102), daß SCMC unter den Bedingungen der salzsauren Proteinhydrolyse stabil ist.

Vorstellbar wäre auch die Bildung von Oxalsäure als Produkt von "Überoxydation" (103) des SCMC durch PAS: zur Beendigung der Oxydation entfernten wir routinemäßig die überschüssige PAS am Rotationsverdampfer; hierbei tritt zunächst eine Konzentrierung des Oxydationsmittels bei erhöhter Temperatur (ca. 35°C) ein, die zur oxydativen Zersetzung des SCMC führen könnte. Tatsächlich zeigte Oxalsäure den R_f -Wert 0,36 (etwa wie "X"). Wurde jedoch zur Verhinderung der "Überoxydation" die PAS vor dem Einrotieren nach (103) durch Zusatz von HBr zerstört, so fanden wir im oxydierten Hydrolysat von CAM-Synthetase die Substanz "X" in unverändertem Ausmaß vor. Zudem ließ "X" sich nicht als Träger zugesetzter Oxalsäure als Calciumoxalat ausfällen (vgl. Kap. 7.3.5). Auch Oxalsäure schied somit als mögliches "X" aus.

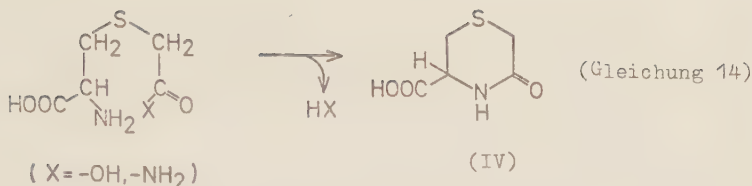
3.2.3 SCMC-Lactam und SCMC-Lactam-sulfon

Die Tatsache, daß Glutaminsäure leicht unter Bildung ihres Lactams Pyrrolidoncarbonsäure (Pyroglutaminsäure) cyclisiert, ist wohl-known (104):



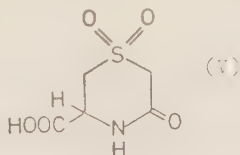
(Gleichung 13)

In analoger Weise sind auch SCMC und sein Amid SCAMC befähigt, in SCMC-Lactam (3-Keto-2H,4H,5H,6H-thiazin-5-carbonsäure, Formel IV) überzugehen:



Über die Bildung von SCMC-Lactam unter verschiedenen Bedingungen wurde mehrfach berichtet (105-108). In dieser Arbeit verwendeten Laufmittelsystem C besitzt SCMC-Lactam den R_f 0,60 und wird demnach nicht gebildet. Dies steht im Einklang zu unserem Befund, daß das Lactam unter den Bedingungen der Proteinhydrolyse quantitativ in SCMC übergeht.

Die im folgenden dargestellten Ergebnisse erlaubten es uns jedoch, "X" als das Sulfon des SCMC-Lactams (3-Keto-2H,4H,5H,6H-thiazin-5-carbonsäure-dioxid, Formel V) zu identifizieren.



3.2.3.1 Wurde dem PAS-oxydierten Hydrolysat von ^{14}C -CAM-Synthetase authentisches SCMC-Lactam-Sulfon (hergestellt durch PAS-

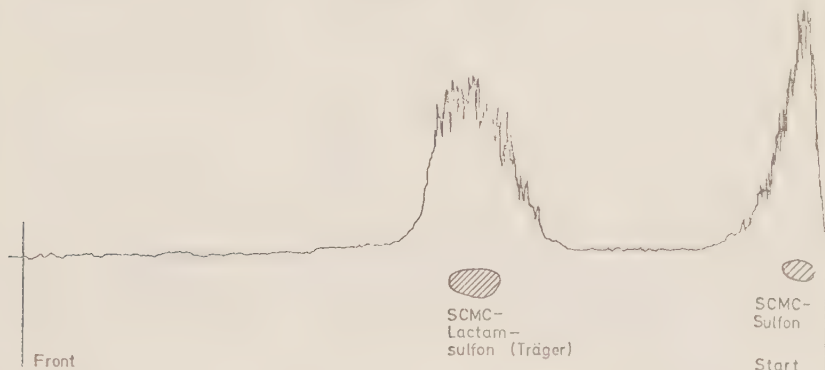


Abb. 16 Radioaktivitätsverteilung im Papierchromatogramm des PAS-oxydierten Hydrolyсата von ^{14}C -CAM-Synthetase mit SCMC-Lactam-sulfon als Träger; Durchführung wie Abb. 15

Oxydation von SCMC-Lactam) zugesetzt, so fanden wir bei der Papierchromatographie den nicht mit Ninhydrin, wohl aber mit dem Säure-Base-Indikator Bromkresolgrün anfärbbaren Substanzfleck des Trägers an der gleichen Stelle wie den Radioaktivitätsgipfel von "X" (vgl. Abb.16).

Reines SCMC-Lactam-sulfon hingegen zeigte geringere R_f -Werte (0,32 bis 0,35); dieser Wert war in starkem Maße von den Anwesenheit anderer Ionen in der Probelösung, aber auch vom Alter der Lösung abhängig.

3.2.3.2 Auch Hochspannungs-Papierelektrophorese bei zwei verschiedenen pH-Werten (pH 3,5 und 6,1) erbrachte identisches Verhalten von "X" und SCMC-Lactam-sulfon (Abb.17). Im dargestellten Experiment wurde aus unbekannten Gründen nicht das übliche 1:2-Verhältnis zwischen SCMC-Sulfon und "X" gefunden.

3.2.3.3 Unter Bedingungen, bei denen der Lactam-Ring des SCMC-Lactams geöffnet wird (z.B. 1 N HCl, 1 h, 110°C (105)), ging vom Papierchromatogramm eluiertes "X" quantitativ in eine Substanz mit R_f 0,05 (entsprechend SCMC-Sulfon) über.

3.2.3.4 Im Hydrolysat von ^{14}C -CAM-Synthetase liegt die gesamte Radioaktivität als ^{14}C -SCMC vor. Bedingungen, die zur Schließung des Lactamringes führen (pH 4,8, 48 h, 110°C (105)), bewirken, daß als einziges radioaktives Produkt SCMC-Lactam (R_f 0,60) gefunden wird. Wird dieses nunmehr mit PAS oxydiert, so tritt im Papierchromatogramm nur ein einziger radioaktives Gipfel mit R_f 0,40 auf (entsprechend "X"); Produkt der PAS-Oxydation von SCMC-Lactam ist aber SCMC-Lactam-sulfon (vgl. präparative Herstellung von SCMC-Lactam-sulfon, Kap.7.3.6).

3.2.3.5 In Übereinstimmung mit dem im allgemeinen gefundenen Mengenverhältnis 1:2 von SCMC-Sulfon und "X" ließen sich ca.30% der im PAS-oxydierten Hydrolysat von ^{14}C -CAM-Synthetase enthaltenen Radioaktivität mit authentischem SCMC-Sulfon bei konstanter spezifischer Radioaktivität umkristallisieren, während ca. 65% mit zugesetztem SCMC-Lactam-sulfon aus der Lösung niedergeschlagen werden konnten.

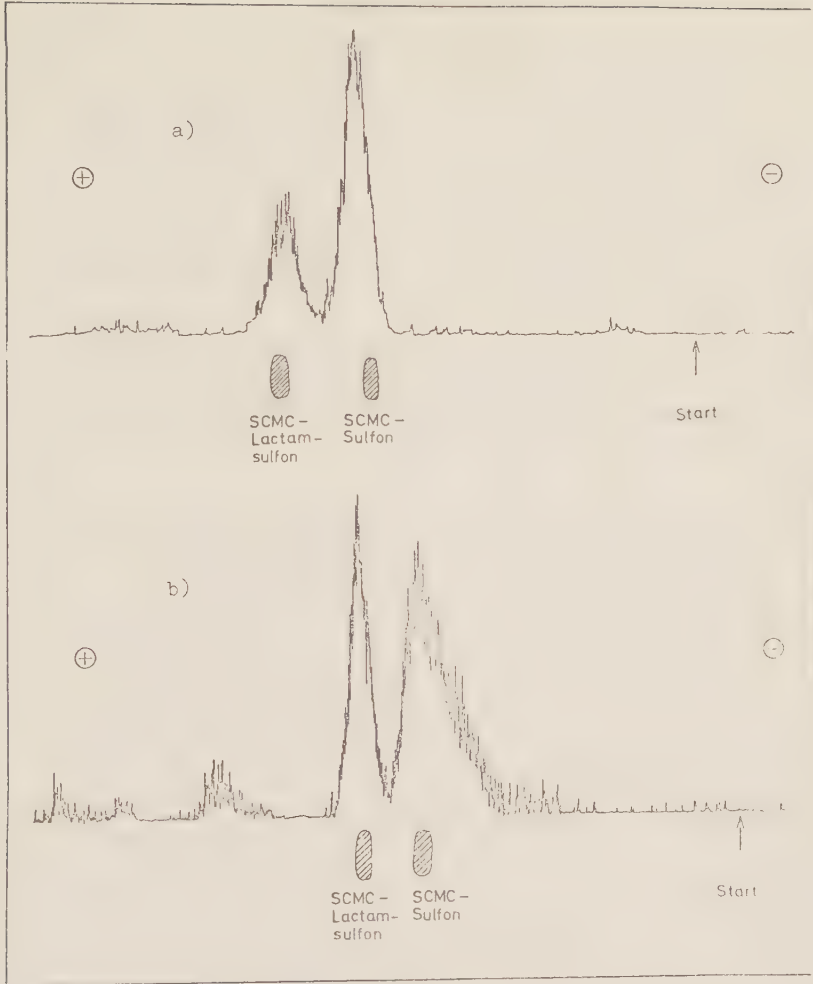


Abb.17 Hochspannungs-Papierelektrophorese des α AS-oxydierten Hydrolysats von ^{14}C -CAM-Synthetase; a) pH 3,5, b) pH 6,1
Durchführung vgl. Kap.7.3.7; Anfärbung der Vergleichssubstanzen wie Abb.14

3.3 Bildungsbedingungen von SCMC-Lactam-sulfon

Mit den in Kap.3.2 dargestellten Ergebnissen sahen wir es als bewiesen an, daß die im PAS-oxydierten Hydrolysat von ^{14}C -CAM-Synthetase auftretende Substanz "X" identisch mit SCMC-Lactam-sulfon ist. Andererseits entsteht aus reinem SCMC bei Behandlung mit PAS kein Lactam-sulfon, sondern nur das offenkettige SCMC-Sulfon. Wir mußten daher annehmen, daß die Bildung dieses in der Literatur bislang nicht beschriebenen Cyclisierungsproduktes auf die Anwesenheit anderer im Hydrolysat enthaltener Substanzen zurückzuführen war.

Diese Folgerung wurde erhärtet durch die Beobachtung, daß das Lactam-sulfon entstand, wenn nicht-radioaktives SCMC zur ^{14}C -CAM-Synthetase zugegeben, die Mischung sodann mit HCl hydrolysiert und anschließend mit PAS oxydiert wurde (vgl. Abb.14, Vergleichssubstanz).

Verantwortlich für den Ringschluß konnten somit die im Hydrolysat als Hydrochloride vorliegenden Aminosäuren oder aber die HCl selbst sein. Zusatz einer Reihe von Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure, Cystein, Serin) zur Mischung von SCMC und PAS führte nicht zur Bildung von SCMC-Lactam-sulfon. Kein Lactam-sulfon entstand auch, wenn die Spaltung von ^{14}C -CAM-Synthetase nicht durch HCl, sondern durch H_2SO_4 bewirkt wurde (die überschüssige Schwefelsäure wurde nach (109) nach der Hydrolyse mit Bariumhydroxid entfernt, die Bariumionen sodann durch Einleiten von CO_2 ausgefällt; vgl. Kap.7.3.8).

Tabelle 8 zeigt, daß zur Bildung von SCMC-Lactam-sulfon aus SCMC mittels PAS die Anwesenheit von Mineralsäure (H^+) und von Chloridionen (Cl^-) erforderlich ist. Ist Chlorid in geringerer als stöchiometrischer Menge vorhanden (weniger als 1 Mol Cl^- pro Mol SCMC), so ist der Anteil des Lactam-sulfons im Produktgemisch (das in allen Fällen noch SCMC-Sulfon enthält) geringer. Andere Anionen sowie Chlorid ohne Zusatz von Mineralsäure bewirkten ebensowenig den Ringschluß wie Anwesenheit von anorganischer Säure in Abwesenheit von Chlorid: in allen diesen Fällen war SCMC-Sulfon einziges Oxydationsprodukt.

SCMC-Lactam-sulfon wurde neben anderen, nicht näher untersuchten Produkten auch gebildet bei Behandlung von SCMC mit Chlor (nicht Brom!) in Ameisensäure sowie von SCMC-Sulfoxid mit HCl in PAS.

Tabelle 8 Bildung von SCMC-Lactam-sulfon

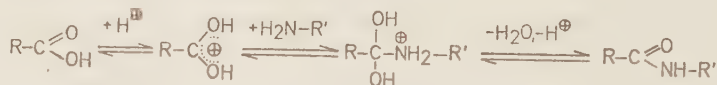
Die angegebenen Proben wurden mit PAS bzw. Ameisensäure behandelt (Durchführung vgl. Kap.7.3.9) und anschließend papierchromatographisch untersucht. Die letzte Spalte gibt an, bei welchen Proben Bildung des Lactam-sulfons (neben anderen Produkten) gefunden wurde.

Probe	Behandlung mit	Bildung von Lactam-sulfon
^{14}C -CAM-Synthetase	HCl, dann PAS	+
	PAS, dann HCl	-
	H_2SO_4 / $\text{Ba}(\text{OH})_2$ / CO_2 , dann PAS	-
^{14}C -CAM-GAPDH	HCl, dann PAS	+
SCMC	PAS	-
	PAS + Aminosäuren	-
	HCl, dann PAS	+
	HCl + PAS: Verhältnis $\text{HCl}:\text{SCMC} > 1$	+
	HCl + PAS: Verhältnis $\text{HCl}:\text{SCMC} < 1$	(+) ^a
	NaCl + PAS	-
	NaCl + H_2SO_4 + PAS	+
	HCl + Ameisensäure	- ^b
	PAS + H_2SO_4 , HNO_3 , H_3PO_4 oder TCE	-
	PAS + H_2SO_4 + KX (X=F, Br, J, CN, SCN, N_3)	-
	Cl_2 + Ameisensäure	+
SCMC-Sulfoxid	HCl + PAS	+
SCMC-Sulfon	HCl + PAS	-
	HCl + Ameisensäure	-

^a: SCMC-Lactam-sulfon gebildet in kleinerer Menge, abhängig vom Verhältnis $\text{HCl}:\text{SCMC}$. - ^b: keine Bildung von SCMC-Lactam.

SCMC-Sulfon hingegen cyclisierte unter diesen Bedingungen nicht. Wir schließen aus diesen Ergebnissen, daß der Ringschluß der Oxydation nicht vorausgeht oder ihr folgt, sondern gleichzeitig mit ihr stattfindet.

Die katalytische Rolle von Protonen bei der Bildung von Amidin aus Amin und Säure ist wohlbekannt (110); sie beruht auf der Erhöhung der Elektrophilie des Carboxyl-Kohlenstoffs durch Protonierung (vgl. Gleichung 15):



(Gleichung 15)

Der spezifische Einfluß von Chloridionen auf die Lactamisierung während der PAS-Oxydation ist schwerer zu interpretieren; als ad hoc-Erklärung brauchbar erscheint die Vermutung, daß chlorierte Zwischenstufen für die beobachtete Erleichterung der Ringschlusses verantwortlich sein könnten (etwa Sulfid-dichloride oder Additionsprodukte von HCl an die SO-Gruppe des intermediär entstehenden Sulfoxids (98)). Solche Intermediate könnten am Schwefelatom Bindungswinkel aufweisen, die den Ringschluß zwischen der α -Aminogruppe und der Σ -Carboxylgruppe sterisch begünstigen.

3.4 Zersetzung von SCMC-Sulfon bei der salzsauren Proteinhydrolyse

Verschiedentlich wurde über Instabilität von SCMC-Sulfon unter den Bedingungen der Proteinhydrolyse mit HCl berichtet (100,111). In Übereinstimmung hiermit fand OESTERHELT, daß bei HCl-Behandlung von PAS-oxydierter ^{14}C -CAM-Synthetase nur etwa die Hälfte der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden wurde; einziges radioaktives Produkt unter diesen Bedingungen war SCMC-Sulfon (96).

Da in OESTERHELTS Versuchen ebenso wie in dieser Arbeit stets carboxyl-markiertes ^{14}C -IAM eingesetzt worden war, hielten wir es für möglich, daß die radioaktive Markierung während der Hydrolyse als $^{14}\text{CO}_2$ abgespalten wird; die strukturelle Ähnlichkeit der α -Sulfonyl-carbonsäuren (wie SCMC-Sulfon) mit den β -Ketocarbonsäuren, deren leichte Decarboxylierung wohlbekannt ist (112), machte eine solche Annahme wahrscheinlich (vgl. Abb.18). Wir behandelten daher ^{14}C -SCMC-sulfon, das aus [$1-^{14}\text{C}$]IAM und

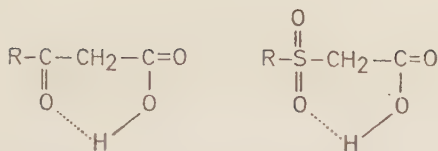


Abb.18 Strukturen von β -Ketocarbonsäuren (links) und α -Sulfonyl-carbonsäuren (rechts)

Cystein durch HCl-Hydrolyse und PAS-Oxydation hergestellt worden war, mit HCl unter den Bedingungen der salzsauren Proteinhydrolyse und verbanden hierbei das Reaktionsgefäß über ein Gasableitungsrohr mit einer Vorlage, die 4 N KOH enthielt. Tatsächlich konnten wir 52% der eingesetzten Radioaktivität als Kalium [^{14}C]carbonat nachweisen. Die Instabilität des SCMC-Sulfons beruht demnach auf Decarboxylierung im sauren Medium unter den Hydrolysebedingungen.

Nach Durchführung dieses Experiments wurde berichtet, das nach HCl-Behandlung von SCMC-Sulfon Pyruvat nachweisbar ist (111). Im obigen Versuch waren wir lediglich am Schicksal der radioaktiven Markierung interessiert gewesen; das nach CO_2 -Abspaltung formal verbleibende S-Methyl-cystein konnte weiterer Umwandlung unterliegen.

In einem weiteren Versuch unterwarfen wir daher ^{14}C -SCMC-Sulfon den Bedingungen der salzsauren Proteinhydrolyse (Restradioaktivität: 60%) und prüften enzymatisch mittels Lactat-Dehydrogenase auf Anwesenheit von Pyruvat (bzw. anderer α -Ketosauren, die von der Dehydrogenase als Substrat akzeptiert werden). Während in Lösungen von SCMC, SCMC-Sulfon, HCl-behandeltem SCMC sowie von HCl-behandeltem und danach PAS-oxydiertem SCMC kein Pyruvat nachweisbar war, fanden wir in der HCl-behandelten SCMC-Sulfon-Lösung in Übereinstimmung mit (111) das Vorhandensein von Brenztraubensäure. Die aus dem enzymatischen Test berechnete Pyruvat-Gesamtmenge betrug 8-9% des eingesetzten SCMC-Sulfons (verglichen mit 40% Radioaktivitätsverlust); α -Ketosaure entsteht demnach bei Behandlung von SCMC-Sulfon mit HCl in durchaus signifikanter Menge, der Verlust an Radioaktivität (durch Decarboxylierung) ist jedoch noch beträchtlich größer, so daß die Pyruvat-Bildung zur Erklärung der Instabilität des SCMC-Sulfons nicht ausreichend ist.

Festzuhalten ist als Ergebnis der in Kap.3.3 und 3.4 dargestellten Experimente, daß die häufig zur "Stabilisierung" der oxydationsempfindlichen Thioäther verwendete Oxydation mit Perameisensäure im Falle des SMC nicht zum erwünschten "stabilen Sulfon" führt, sondern je nach den Bedingungen zu einer Substanz, die zwar das SMC-Sulfon ist, aber - gegen HCl - nicht stabil; oder zu einer Substanz, die nicht SMC-Sulfon ist (sondern dessen Ringschlußprodukt).

4

Die chemische Umgebung der CAM-Bindungsstellen

4.1 Allgemeines

Nachdem bewiesen war, daß IAM in der die Fettsäuresynthese inhibierenden Reaktion nur mit Cysteinresten des Proteins reagiert, war nunmehr zu fragen, ob die Primärstrukturen in der Umgebung der drei CAM-Bindungsstellen identisch sind: wegen des vermutlich hexameren Aufbaus des Enzymkomplexes (vgl. Kap. 5) müssen mehrere äquivalente Cysteinreste vorhanden sein; denkbar wäre aber auch, daß IAM mit Cystein-Thiolgruppen in Reaktion tritt, die sich in unterschiedlichen Abschnitten der Aminosäuresequenz befinden.

Enzymatische Hydrolyse von ^{14}C -CAM-Synthetase durch Trypsin sollte zur Lösung aller von Lysin- und Arginin-Resten ausgehenden Peptidbindungen führen und bei Identität der drei CAM-Bindungsstellen nur ein einziges, radioaktiv markiertes Spaltpeptid liefern (in einer Ausbeute von 3 Mol Peptid pro Mol Synthetase). OESTERHELT fand jedoch, daß bei Durchführung dieses Experiments zwei radioaktive Peptide T_A und T_B entstehen, die sich durch Gelchromatographie voneinander trennen ließen (61); er war nicht in der Lage, das größere Peptid T_A in das kleinere T_B überzuführen und schloß daraus, daß die Heterogenität der Spaltstücke nicht auf unvollständige Verdauung, sondern auf die Existenz zweier verschiedener CAM-Bindungsstellen zurückzuführen sei.

Die in Kap. 2 und Kap. 3 dargestellten Untersuchungen hatten ergeben, daß eine Reihe von Befunden, die zunächst als Hinweis auf die Existenz zweier CAM-Bindungsstellen gedeutet worden waren, diese Annahme nicht erforderlich machen. Erneute Überprüfung der Natur der tryptischen Spaltstücke von CAM-Synthetase war daher notwendig.

4.2 Tryptische Spaltung von ^{14}C -CAM-Synthetase

Wir behandelten ^{14}C -CAM-Synthetase unter den von OESTERHELT angegebenen Bedingungen mit Trypsin (Zimmertemperatur, Inkubationsdauer 20 h (61)) und unterwarfen das Spaltgemisch der Gel-filtration an Sephadex G-50 in 50% Essigsäure. Wie Abb.19 zeigt, fanden wir in Übereinstimmung mit (61) zwei radioaktive Spaltstücke, die wir nach OESTERHELT als T_A (K_{av} -Wert 0,44) bzw. T_B (K_{av} 0,74) bezeichneten.

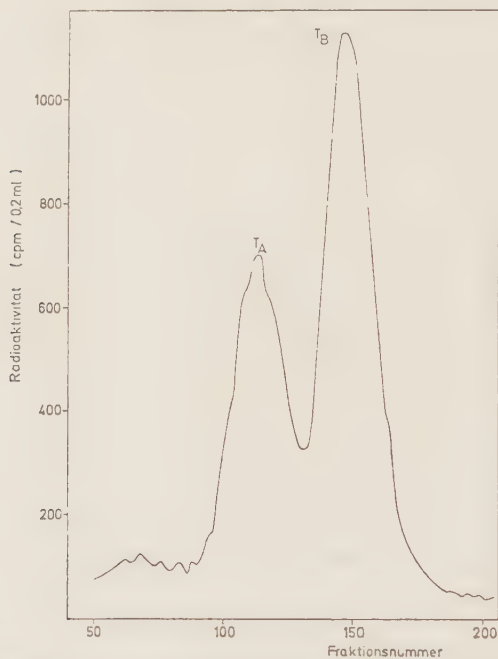


Abb.19 Sephadex G-50-Chromatographie des tryptischen Hydrolysats von ^{14}C -CAM-Synthetase

Beladungsbedingungen: 0,1 M K-PO_4 , pH 6,5; 0,4 mM ^{14}C -IAM; 0°C , 24 h. - Spaltung: das TCE-denaturierte Enzym wurde in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,1, 1 mM Ca^{++} , suspendiert; 0,3 mg/ml TPCK-Trypsin; Inkubation 20 h bei 25°C , unter Rühren. - Chromatographie: Säule 2 x 74,5 cm; Eluant 50% Essigsäure; Fraktionsvolumen 1,3 ml. 0,2 ml jeder zweiten Fraktion wurden zur Radioaktivitätsbestimmung verwendet.

Ergebnislos wurden zunächst einige Hypothesen überprüft, die die Bildung zweier verschiedener CAM-Peptide hätten erklären können:

- OESTERHELT hatte gefunden, daß bei kürzerer Verdauungszeit nur unvollständige Spaltung eintritt; auch T_A könnte Produkt unzureichenden Abbaus sein und bei weiterer Inkubation mit Trypsin in T_B übergehen. Verlängerung der Verdauungszeit auf 48 Stunden bei Zimmertemperatur erbrachte jedoch keine signifikante Änderung des Elutionsprofils, ebenso Zusatz von weiterem Trypsin nach 8 Stunden Verdauungsdauer.

- T_A könnte eine Disulfidbindung enthalten, während das über die Cystin-Brücke gebundene, nicht-radioaktive Teilpeptid in T_B infolge partieller Reduktion fehlen könnte. OESTERHELT hatte diese Möglichkeit durch Behandlung von T_A mit Perameisensäure ausgeschlossen; übereinstimmend ergab sich, daß auch nach Inkubation von T_A mit DTT bei 50°C das Peptid unverändert eluiert wurde.

- Die Bildung von T_A und T_B könnte auf Verunreinigung des Trypsins mit Chymotrypsin zurückzuführen sein. Wir verwendeten jedoch Trypsin, das mit den chymotrypsin-spezifischen Inhibitoren DCC (113) und TPCK (114) behandelt worden war, ohne sichtbare Differenz der Ergebnisse. Andererseits setzten wir Chymotrypsin unter den üblichen Bedingungen der Trypsinspaltung, jedoch in nur 1,5% der Konzentration ein, die im allgemeinen für Trypsin verwendet wurde; das Chymotrypsin (das somit etwa in der Konzentration vorlag, in der es im kommerziellen Trypsin maximal hätte vorhanden sein können) war hierbei nicht in der Lage, T_A in T_B umzuwandeln.

- Käufliche Bäckerhefe liefert nach Untersuchungen von SCHWEIZER (115) eine Fettsäuresynthetase, bei deren Untersuchung mit Hilfe der SDS - Polyacrylamidgel - Elektrophorese neben den Proteinbanden A und B (vgl. Kap.5) noch eine durch partielle Proteolyse von A entstandene Komponente C sowie ggf. weitere Spaltstücke gefunden werden. Das Auftreten von T_A und T_B wäre erklärlich, wenn beim Übergang von A in C gerade eine in T_A enthaltene Peptidbindung gelöst würde; T_A würde dann aus Polypeptid A, T_B aus Polypeptid C entstehen. Versuche mit Fettsäuresynthetase aus käuflicher Bäckerhefe, aus frischer Bierhefe sowie aus unter kontrollierten Bedingungen gezüchteten Hefezellen (vgl. Kap.5) lieferten jedoch keine Stütze für diese Hypothese. Der bei Verwendung der kleinen Proteinmengen eingesetzte große Trypsin-Überschuß führte hierbei jedoch dazu, daß sich das Produktverhältnis der Spaltung stark zugunsten von T_B verschob (vgl. Kap.5.2, Abb.29).

Ferner stellten wir fest, daß das Mengenverhältnis $T_A:T_B$ von der Höhe der spezifischen Beladung der Synthetase mit CAM-Resten unabhängig war, gelegentlich jedoch in zunächst unerklärlicher Weise bei verschiedenen Spaltungsansätzen des gleichen ^{14}C -CAM-Synthetasepräparates schwankte. Nur in manchen Fällen betrug es etwa 1:2 (wie es bei Annahme zweier Bindungsstellen zu erwarten gewesen wäre). Wir untersuchten deshalb die Abhängigkeit des Produktverhältnisses von den Verdauungsbedingungen und fanden, daß der Anteil von T_A am Produktgemisch in starkem Maße von der Verdauungstemperatur (Tabelle 9) und der eingesetzten Trypsinmenge (Tabelle 10) abhängig ist. Durch geeignete Wahl der Bedin-

Tabelle 9 Abhängigkeit der Produktverteilung von der Verdauungstemperatur

^{14}C -CAM-Synthetase wurde mit TPCK-Trypsin behandelt (Bedingungen vgl. Kap.7.4.1); Gewichtsverhältnis Synthetase:Trypsin = 3,3. Bei Chromatographie an Sephadex G-50 (Bedingungen wie Abb.19) wurde folgender Anteil von T_A an der gesamten eluierten Radioaktivität gefunden.

Verdauungstemperatur °C	% T_A
4	94
20	52
30	36

Tabelle 10 Abhängigkeit der Produktverteilung von der Trypsinmenge

^{14}C -CAM-Synthetase wurde bei 30°C mit TPCK-Trypsin behandelt; Gewichtsverhältnis Synthetase:Trypsin wie angegeben. Bei Chromatographie an Sephadex G-50 (Bedingungen wie Abb.19) wurde folgender Anteil von T_A an der gesamten eluierten Radioaktivität gefunden.

$\frac{\text{CAM-Synthetase}}{\text{Trypsin}}$ (g/g)	% T_A
6,3	64
1,25	12
0,5	<3

gungen konnten T_A oder T_B als jeweils nahezu einziges radioaktives Spaltprodukt (Anteil mehr als 90%) erhalten werden. In einigen Experimenten schwankte allerdings das Verhältnis $T_A:T_B$ trotz möglichst sorgfältig kontrollierten Bedingungen in unverständlicher Weise; offenbar können sehr geringe Änderungen der Spaltungsbedingungen das Produktmuster erheblich verändern. Wir versuchten nicht, die hierfür verantwortlichen Faktoren bis ins einzelne aufzuklären.

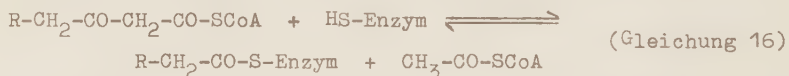
Auch T_A ließ sich bei 30°C mit viel Trypsin (Peptid:Trypsin = 0,5 g/g) vollständig in T_B überführen. Aufbewahrung in 50% Essigsäure oder Inkubation unter den Spaltungsbedingungen ohne Trypsinzusatz hingegen führte nicht zur Spaltung von T_A .

Es war durch diese Ergebnisse klar, daß die Bildung der zwei tryptischen Spaltstücke T_A und T_B kein Ausdruck des Vorhandenseins zweier verschiedener CAM-Bindungsstellen sein konnte. Die Heterogenität des Spaltungsgemischs mußte vielmehr darauf zurückzuführen sein, daß Peptid T_A eine von Trypsin nur sehr langsam angegriffene Bindung enthielt; mit größeren Mengen der Protease (die in unseren Versuchen ggf. in größerer Menge eingesetzt wurde als ihr Substrat!) oder bei erhöhter Temperatur wurde nur das kleinere Spaltstück T_B gewonnen, das auch aus T_A durch Behandlung mit Trypsin erhalten werden konnte. Die Ursache für die Bildung der zwei radioaktiv markierten Peptide war demgemäß in der Spezifität der Protease zu suchen und wurde von uns nicht weiter erforscht; eine mögliche Erklärung für die langsame Bildung von T_B ergab sich aus der Aminosäure-Zusammensetzung des Peptids (vgl. Kap.4.4.7).

Andererseits wurde die Existenz einer zweiten CAM-Bindungsstelle durch unsere Ergebnisse noch nicht völlig ausgeschlossen. In den Fraktionen " T_A " und " T_B " befanden sich ja keineswegs reine Peptide, sondern Mischungen einer großen Zahl von Spaltstücken ähnlichen Molekulargewichtes. Zwar erschien es zunächst nicht allzu wahrscheinlich, daß zwei unterschiedliche tryptische Peptide der Größe von T_A bei weiterer Trypsin-Behandlung beide in kleinere Peptide der Größe von T_B übergehen würden; zur völligen Widerlegung dieser Hypothese war es jedoch erforderlich, die CAM-Peptide über weitere Stufen zu reinigen (vgl. Kap.4.4).

4.3 CAM-Bindungsstelle und periphere SH-Gruppe

Noch aus einem anderen Grund war die Reinigung von ^{14}C -CAM-Peptiden von Interesse: sofern der mit IAM reagierende Cysteinrest mit der peripheren SH-Gruppe der Synthetase identisch ist, ermöglicht Alkylierung des Enzyms mit ^{14}C -IAM eine selektive Markierung des aktiven Zentrums der kondensierenden Enzymkomponente. HAGEN wies als erster darauf hin (68), daß sich hierdurch die Möglichkeit bietet, nach partieller enzymatischer Hydrolyse Peptide zu erhalten, die an der peripheren SH-Gruppe den ^{14}C -CAM-Rest tragen. Die Aufklärung ihrer Sequenz würde nicht nur zur Kenntnis der Struktur der Fettsäuresynthetase beitragen, sondern überdies den Vergleich mit der von GEHRING aufgeklärten Sequenz des aktiven Zentrums von Thiolase (116,117) ermöglichen. Thiolase spielt beim Abbau der Fettsäuren durch β -Oxydation die entsprechende Rolle wie das kondensierende Enzym bei der Fettsäuresynthese; auch Thiolase enthält einen essentiellen Cysteinrest, der intermediär als Bindungsstelle eines Acylrestes dient (28, 118):



Der prinzipiell am nächsten liegende Weg der radioaktiven Markierung der peripheren SH-Gruppe der Fettsäuresynthetase wäre die Verwendung von ^{14}C -AcetylCoA; die periphere SH-Gruppe wurde ja als Acetyl-Bindungsstelle am kondensierenden Teilenzym definiert (vgl. Kap.1.2). Folgende Vorteile bietet jedoch die Umsetzung mit radioaktivem IAM:

- Der CAM-Rest wird unter den geeigneten Bedingungen ausschließlich an die periphere SH-Gruppe gebunden, während der Acetylrest auch mit der zentralen SH-Gruppe und der Acetyl-Transferase-Komponente reagiert;
- Die Thioätherbindung der CAM-Gruppe zum Cystein-Schwefel ist sehr stabil, während an die Synthetase gebundene Acetylreste mit beträchtlicher Geschwindigkeit abhydrolysiert werden (Deacylase-wirkung, vgl. (61,65,67));
- Auch chemisch ist die Thioätherbindung sehr beständig. Thio-

esterbindungen hingegen werden durch Alkali leicht gespalten (so daß z.B. Trypsin nicht in seinem Aktivitätsoptimum zur Verdauung eingesetzt werden kann: (71)) und sind auch gegen starke Säuren instabil (so daß die radioaktive Markierung etwa bei salzsaurer Proteinhydrolyse verloren geht). Alle Schritte der Peptidreinigung können bei Acetyl-Markierung also nur im neutralen oder schwach sauren Bereich durchgeführt werden. Die Auswahl der anwendbaren Reinigungsprozeduren wird hierdurch stark eingeschränkt;

- ^{14}C -IAM ist kommerziell mit hoher Reinheit und hoher spezifischer Radioaktivität erhältlich. Bei Eigenherstellung von ^{14}C -AcetylCoA muß mit der Notwendigkeit von Reinigungsprozeduren gerechnet werden; käufliches radioaktives AcetylCoA andererseits ist außerordentlich teuer.

Voraussetzung für die Verwendung von ^{14}C -IAM zur Markierung der peripheren SH-Gruppe ist jedoch der einwandfreie Nachweis, daß CAM-Bindungsstelle und acetyl-bindendes Thiol tatsächlich identisch sind. Im folgenden soll kurz zusammengestellt werden, welche experimentellen Befunde gemeinsam beweisen, daß der mit IAM reagierende Cysteinrest mit der peripheren SH-Gruppe identisch ist.

- 1. Beladung der Synthetase mit Acetylresten (nicht aber mit Malonylresten) schützt das Enzym vor Inaktivierung durch IAM; es findet nur in dem Maße Einbau von CAM-Resten statt, in dem die Acetylgruppe abdissoziiert. Gehemmt wird durch IAM ausschließlich die Kondensationsreaktion (vgl. Kap.2).

- 2. Beladung der Synthetase mit IAM verhindert die Bindung von Acetylresten an die periphere SH-Gruppe (OESTERHELT, (61)).

- 3. Reaktion der Synthetase mit IAM verhindert die Bindung des Palmitoylrests an die periphere SH-Gruppe: im tryptischen Hydrolysat von zuerst mit IAM, dann mit ^{14}C -PalmitoylCoA behandelter Synthetase fehlt das der peripheren SH-Gruppe zugeschriebene Palmitoyl-Peptid (AYLING, (119); dieses Ergebnis konnte allerdings von SCHRECKENBACH (120) nicht reproduziert werden).

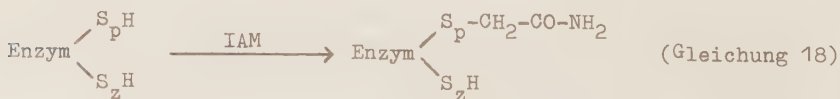
- 4. Die nach Spaltung von ^{14}C -CAM-Synthetase mit Pepsin erhaltenen radioaktiven Bruchstücke verhalten sich bei Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex ebenso wie die bei Pepsinspaltung von ^{14}C -Acetyl-Enzym gewonnenen, der peripheren SH-Gruppe

zugehörigen Spaltpeptide (OESTERHELT, (61)).

- 5. Nach Trypsinspaltung von ^{14}C -Acetyl-Synthetase erhielten wir durch aufeinanderfolgende Sephadex G-50-Chromatographie, Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex, Hochspannungs-Papier-elektrophorese und Papierchromatographie ein Acetylpeptid, das identisches Verhalten mit CAM-T_B zeigte. Die Radioaktivitätsverteilung des abschließenden papierchromatographischen Schrittes für das tryptische Acetyl-Peptid $\text{T}_{1,2}$ und das CAM-Peptid T_B ist in Abb. 20 dargestellt; die in Acetyl- T_2 befindliche Radioaktivität wurde durch PAS freigesetzt (der Acetylrest ist somit als Thioester gebunden). Zur Durchführung des Versuches, vgl. Kap. 7.4.6.

Die unter Punkt 1. bis 3. dargestellten Ergebnisse ließen sich allenfalls so verstehen, daß ein an die periphere SH-Gruppe gebundener Acetylrest und ein an einen anderen Cysteinrest gebundener CAM-Rest ihre Inkorporierung infolge sterischer Hinderung oder induzierter Konformationsänderung gegenseitig unmöglich machen. Nach 4. und 5. wäre dann allerdings zu fordern, daß die beiden Bindungsstellen sich nicht nur in räumlicher Nähe, sondern auch in der Primärstruktur in naher Nachbarschaft befinden müßten; sowohl tryptische wie peptische, die periphere SH-Gruppe (Acetyl-Bindungsstelle) enthaltende Spaltpeptide müßten gleichzeitig einen weiteren Cysteinrest (die CAM-Bindungsstelle) enthalten.

Es sei vorweggenommen, daß die Analyse der Aminosäurezusammensetzung des gereinigten CAM-Peptids T_B (vgl. Kap. 4.4.7) zeigte, daß das Peptid neben dem ^{14}C -SCAMC kein weiteres Cystein mehr enthielt. Da die chemische Natur der peripheren Thiolgruppe bekannt und die Bindung des Acetylrests an Cystein bewiesen ist (61), bedeutet dieses Ergebnis den endgültigen Beweis dafür, daß IAM tatsächlich mit der peripheren SH-Gruppe der Synthetase in Reaktion tritt; CAM-Bindungsstelle und Acetyl-Bindungsstelle sind identisch. Schematisch wird die Umsetzung des IAM mit Fettsäuresynthetase (bei 0°C) demnach durch (Gleichung 18) wiedergegeben:



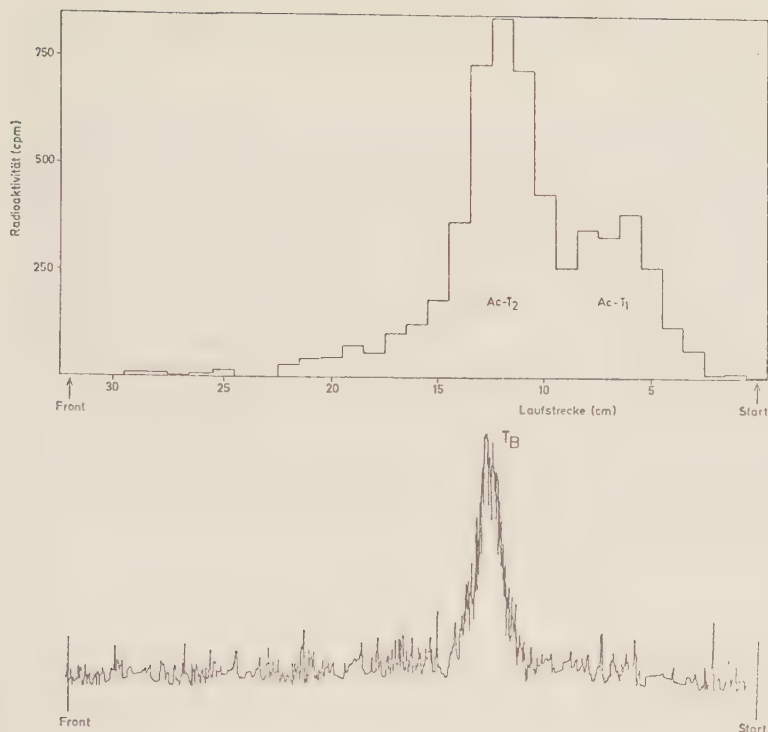


Abb.20 Radioaktivitätsverteilung im Papierchromatogramm des ^{14}C -Acetyl-Peptids $T_{1,2}$ und des ^{14}C -CAM-Peptids T_B . Acetyl- $T_{1,2}$ wurde vorher durch Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie und Hochspannungselektrophorese gereinigt und verhielt sich bei allen diesen Schritten identisch mit T_B ; Bedingungen vgl. Kap.7.4.6. Die Radioaktivitätsverteilung für T_B wurde im Streifenzähler ermittelt; die Acetyl-Peptide wurden durch Zerschneiden des Papierstreifens in Stücke von 1 cm Länge und Zählung im Szintillationszähler lokalisiert.

Reaktion gemäß (Gleichung 18) war, wie erwähnt (Kap.1.3), bereits von HAGEN angenommen worden (68); seine experimentellen Beweise für diese Behauptung sind jedoch, rückblickend betrachtet, keineswegs als hinreichend anzusehen, um die Identität der Bindungsstellen für CAM-Reste und Acetyl-Gruppen als eindeutig feststehend zu betrachten. OESTERHELTS Annahme einer zweiten CAM-Bindungsstelle hingegen (61) erwies sich als unrichtige Deutung einer Anzahl exakter und reproduzierbarer Experimente.

4.4 Reinigung eines tryptischen CAM-Peptids

4.4.1 Allgemeines

Fettsäuresynthetase enthält etwa 2000 Lysin- und Argininreste pro Enzymmolekül (44). Nach Verdauung des CAM-Enzyms mit Trypsin sind daher etwa 2000 Spaltpeptide zu erwarten; ihre Zahl reduziert sich allerdings auf etwa 350 verschiedene Spaltstücke, wenn man hexameren Aufbau des Komplexes annimmt (vgl. Kap.5.4).

Um die Bedingungen für die effektive Reinigung eines einzelnen dieser 350 Peptide (nämlich desjenigen, das die radioaktive CAM-Markierung trägt) zu ermitteln, untersuchten wir zunächst das Verhalten der CAM-Peptide T_A und T_B bei Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie. Als Methoden zur weiteren Reinigung kamen insbesondere die Hochspannungs-Papierelektrophorese und die Papierchromatographie in Betracht, die über geringere Beladungskapazität, aber hohe Trennleistung verfügen.

4.4.2 Trennung nach Größe: Verhalten von T_A und T_B bei der Gelfiltration

Chromatographie des tryptischen Hydrolysats von ^{14}C -CAM-Synthetase an Sephadex G-50 hatte bereits gezeigt (vgl. Kap.4.2), daß die zwei radioaktiven CAM-Spaltpeptide T_A und T_B in ihrer Größe unterschiedlich sind und getrennt werden können. Verfolgung der Elution von Peptidmaterial durch Messung der Extinktion bei 280 nm mit Hilfe eines Durchflußphotometers (Abb.21, Kurve II) zeigte, daß T_B zusammen mit dem Hauptteil der Spaltpeptide eluiert wurde. Die Größenordnung des Molekulargewichts von T_B läßt sich hieraus abschätzen zu $2,3 \cdot 10^6 / 2000 = 1150$. T_A hingegen wurde vom größten Teil der nicht-radioaktiven Spaltstücke abgetrennt. Aus einem Trypsin-Spaltungsansatz von CAM-Synthetase läßt sich deshalb T_A effektiver durch G-50-Chromatographie reinigen als T_B .

T_A ist in Wasser schwerlöslich; nach (61) zogen wir es aus diesem Grunde vor, die Gelfiltration in Essigsäure/Wasser (1:1, v/v)

durchzuführen. Sephadex G-50 zeigt in dieser Mischung gute Quellungseigenschaften.

Auf Sephadex-Säulen der von OESTERHELT verwendeten Dimensionen (vgl. Abb.19, S.44) war eine vollständige Trennung der beiden radioaktiven Peptide in einem Schritt nicht zu erreichen (Rechromatographie der getrennten Peptidgipfel an der gleichen Säule ergab jedoch symmetrische Elutionsgipfel). Beim Übergang zu für präparative Zwecke benutzten Säulen etwa gleicher Länge, jedoch größeren Durchmessers erzielten wir trotz im Verhältnis zum Säulengesamtvolumen gleicher Probe- und Fraktionsvolumina eine erheblich bessere Separierung der T_A - und T_B -Gipfel (vgl. Abb.21). Ursache hierfür sind möglicherweise Adsorptionseffekte, die an der Glaswand der engen Säulen auftreten können.

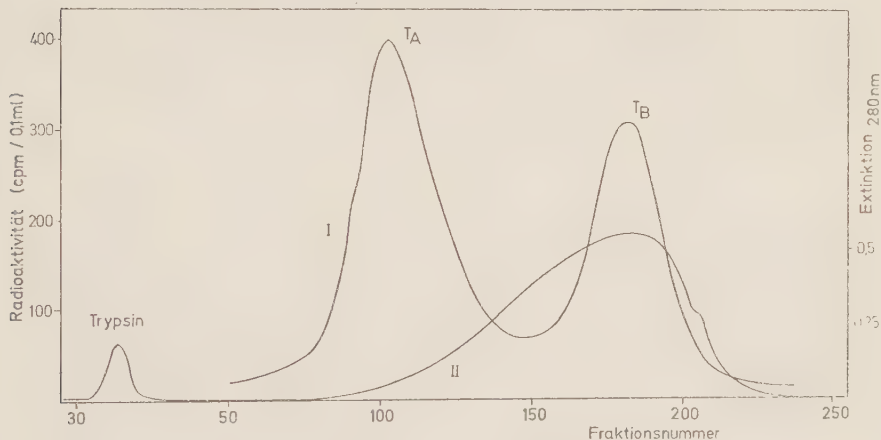


Abb.21 Sephadex G-50-Chromatographie des tryptischen Spaltgemischs von ^{14}C -CAM-Synthetase

Kurve I: Radioaktivitäts-Elutionsprofil; Kurve II: Extinktion bei 280 nm. - Säule: 4,65 x 73 cm; Eluant: 50% Essigsäure; Probevolumen 20 ml; Fraktionsvolumen: Fr.1-52 9 ml, Fr.53-250 3,6 ml. 0,2 ml jeder zweiten Fraktion wurden zur Radioaktivitätsmessung verwendet; mit Hilfe eines Durchflußphotometers wurde die Transmission bei 280 nm kontinuierlich gemessen und manuell in Extinktionswerte umgerechnet.

4.4.3 Trennung nach Ladung: Verhalten von T_A und T_B bei der Ionenaustauschchromatographie

Vorversuche zeigten, daß zur Trennung von T_A und T_B Anionenaustauscher geeignet zu sein schienen; wir verwendeten DEAE-Sephadex A-25. Als Startpuffer diente 0,05 M Collidin-Acetat, pH 7,8 (oder pH 7,6); im weiteren Verlauf der Elution verwendeten wir einen linearen Gradienten des Startpuffers gegen 0,75 M Pyridin-Acetat, pH 6,0 oder 6,2. Dieser zweite Puffer wurde sodann zur Elution der restlichen Radioaktivität verwendet. Abbildung 22 zeigt, daß unter diesen Bedingungen T_B mit dem Startpuffer eluiert wird; T_A hingegen bleibt vollständig am Ionenaustauscher gebunden und wird erst vom Puffer II eluiert. Wegen der hohen optischen Dichte der in den Puffern enthaltenen Basen war eine photometrische Verfolgung der Peptid-Elution nicht möglich. Durch den als Tüpfelreaktion auf Filterpapier durchgeführten Ninhydrin-Test ließ sich jedoch zeigen, daß zahlreiche nicht-radioaktive Peptide abgetrennt wurden.

4.4.4 Reinigungsgang für Peptid T_B

Bei ersten Versuchen zeigte sich, daß Peptide der Größe von T_A nicht effektiv auf Papier als Träger durch Elektrophorese oder Chromatographie gereinigt werden können. In Übereinstimmung mit Literaturangaben (121) fanden wir, daß T_A (vermutete Größe nach (61): ca. 30-35 Aminosäurereste) so stark am Papier adsorbiert wird, daß das Peptid bei Elektrophorese am Start verbleibt. Bei Papierchromatographie fanden wir je nach dem verwendeten Laufmittel die T_A -Radioaktivität entweder ebenfalls am Start oder über nahezu die gesamte Laufstrecke verschmiert. Da ein entsprechendes Verhalten auch für Begleitpeptide gleichen Molekulargewichts zu erwarten war, schien uns der Versuch einer Reinigung von T_A nicht unbedingt erfolgversprechend.

Andererseits führten die säulenchromatographischen Reinigungsschritte wie oben dargestellt zu einer effektiveren Reinigung von T_A als von T_B . Da unser Ziel darin bestand, ein Peptid zu isolieren,

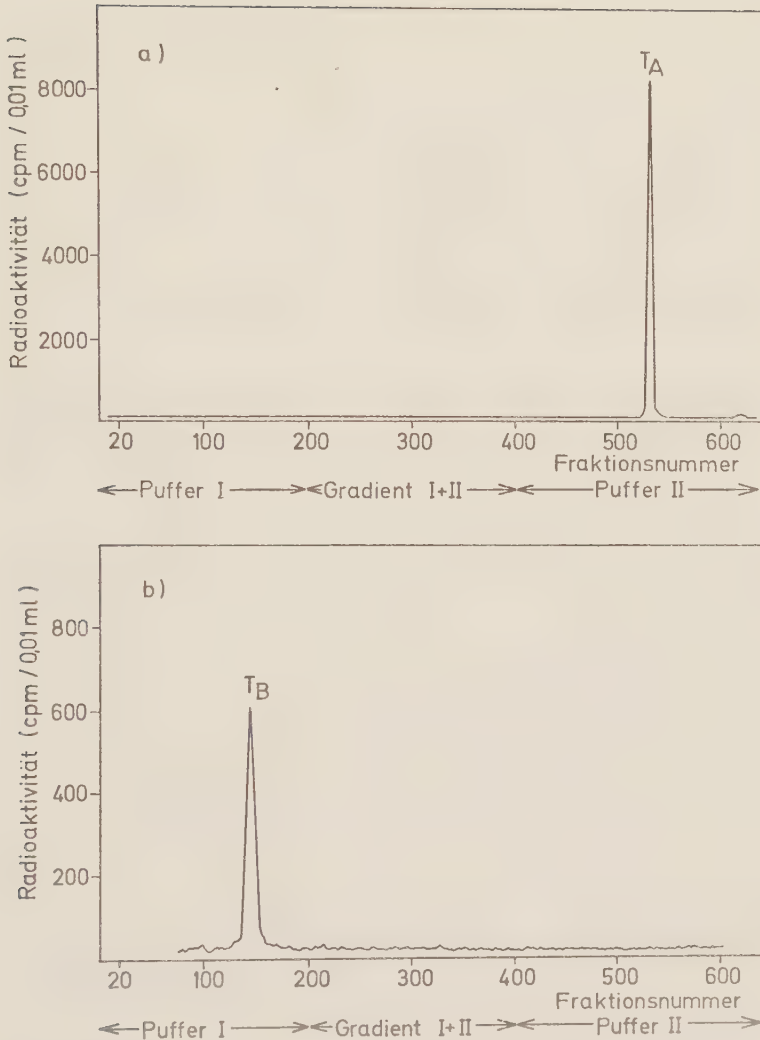


Abb.22 DEAE-Sephadex-Chromatographie von T_A und T_B

Austauscher: DEAE-Sephadex A-25; Puffer I: 0,05 M Collidin-Acetat, pH 7,8; Puffer II: 0,75 M Pyridin-Acetat pH 6,0. Jeweils 10 μ l jeder zweiten Fraktion wurden zur Radioaktivitätsmessung verwendet. - a) T_A : Säule 3,6 x 98 cm; Fraktionsvolumen 5 ml; Probevolumen 50 ml. - b) T_B : Säule 1,4 x 105 cm; Fraktionsvolumen 5,4 ml; Probevolumen 10 μ l.

das die CAM-Bindungsstelle enthielt, und da T_B diese Voraussetzung erfüllte, verzichteten wir vorerst darauf, Peptid T_A bis zum verunreinigungsfreien Zustand zu reinigen; folgende Strategie schien uns erfolgversprechend:

- Beladung der Synthetase mit ^{14}C -IAM
- Spaltung mit wenig Trypsin bei 4°C (ergibt T_A)
- G-50- und DEAE-Chromatographie
- Nachspaltung des vorgereinigten T_A mit viel Trypsin bei $25\text{--}30^\circ\text{C}$ (führt T_A in T_B über)
- G-50- und DEAE-Chromatographie
- Weitere Reinigung von T_B durch Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie.

Es war zu hoffen, daß der Großteil der nach den ersten zwei säulen-chromatographischen Schritten das Peptid T_A noch verunreinigenden Peptide bei Nachbehandlung mit Trypsin nicht weiter abgebaut werden würden. Sie sollten sich dann bei erneuter Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie weiterhin wie T_A verhalten und sehr wirkungsvoll vom durch Nachspaltung erhaltenen T_B abgetrennt werden. Dieser Strategie der Peptidreinigung liegt das gleiche Prinzip zugrunde wie den von HARTLEY (122) angegebenen "diagonalen" Verfahren: man unterwirft ein Substanzgemisch einem beliebigen Fraktionierungsverfahren und eliminiert so alle Begleitsubstanzen, die hierbei ein anderes Verhalten zeigen als die erwünschte Verbindung. Sodann verändert man diese chemisch in spezifischer Weise, so daß sie sich bei erneuter Durchführung der gleichen Trennoperation von den unverändert gebliebenen Verunreinigungen abtrennen läßt. - Eine entsprechende Arbeitsweise wurde in unserem Arbeitskreis von SCHIELE bei der Untersuchung von Biotin-Peptiden angewendet (123).

Es erwies sich hierbei als zweckmäßig, die tryptische Spaltung von CAM-Synthetase zu T_A in Collidin-Acetat-Puffer (0,05 M, pH 7,8) vorzunehmen. Die Ergebnisse der Spaltung unterschieden sich nicht feststellbar von denen, die wir mit Tris-HCl, pH 8,1 (1 mM Ca^{++}), erhielten (obwohl der Collidin-Puffer kein Ca^{++} enthielt, das nach (124) zur Stabilisierung des Trypsins erforderlich ist). Es war hierdurch möglich, die Spaltungsmischung - ohne Abstoppen der Hydrolyse - direkt zur Ionenaustauschchromatographie auf die mit dem gleichen Puffer äquilibrierte DEAE-Sephadex-Säule zu pipettieren. Da T_A unter den Startbedingungen vollständig von der Säule

festgehalten wird, spielt das Probenvolumen für die Trennwirkung keine Rolle (125). Wurde der Spaltungsansatz hingegen zuerst der Gelchromatographie an Sephadex G-50 unterzogen, so war es erforderlich, die Spaltungsmischung zunächst zur Trockne zu bringen und sie dann in einem möglichst kleinen Volumen des Säulenpuffers (50% Essigsäure) aufzunehmen. Trotz Verwendung einer Säule von mehr als 1 l Totalvolumen war es bei präparativen Ansätzen (1-2 g Synthetase) dadurch notwendig, zur Vermeidung zu großer Probevolumina (die die Trennung verschlechtert hätten) die Mischung in bis zu 10 Anteilen nacheinander zu chromatographieren. Dies bedeutete einen erheblichen Arbeitsaufwand und die Gefahr von Substanzverlusten.

Nach der Nachspaltung von T_A in T_B andererseits wäre es erforderlich gewesen, ein möglichst kleines Probevolumen auf die DEAE-Sephadex-Säule aufzutragen (T_B wird ja mit dem Startpuffer eluiert). Wir zogen es deshalb vor, die Nachspaltung in Tris-HCl-Puffer (1 mM Ca^{++}) vorzunehmen, die nach der Vorreinigung ja viel geringere Peptidmenge zuerst über Sephadex G-50 zu chromatographieren (dies war stets in einem einzigen Ansatz möglich) und die T_B enthaltenden Fraktionen anschließend weiter über DEAE-Sephadex zu reinigen.

Bemerkt sei, daß T_A von der DEAE-Säule stets zusammen mit einer tiefgelben Verunreinigung eluiert wurde; diese wurde nach der Nachverdauung bei der zweiten DEAE-Chromatographie abgetrennt.

Wir führten mehrere präparative Beladungs-, Spaltungs- und Reinigungsansätze durch. Abbildung 23 zeigt das Schema einer solchen Peptidreinigung; ausgehend von 1,5 g Fettsäuresynthetase erhielten wir nach den zwei Verdauungs- und insgesamt fünf Säulenschritten 486 nMol T_B -Peptid (entsprechend einer Ausbeute über alles von 23%). So gereinigtes Peptid zeigte jedoch bei der Bestimmung der Amino-Endgruppe mit Dansylchlorid noch zahlreiche Flecken, war also keineswegs einheitlich.

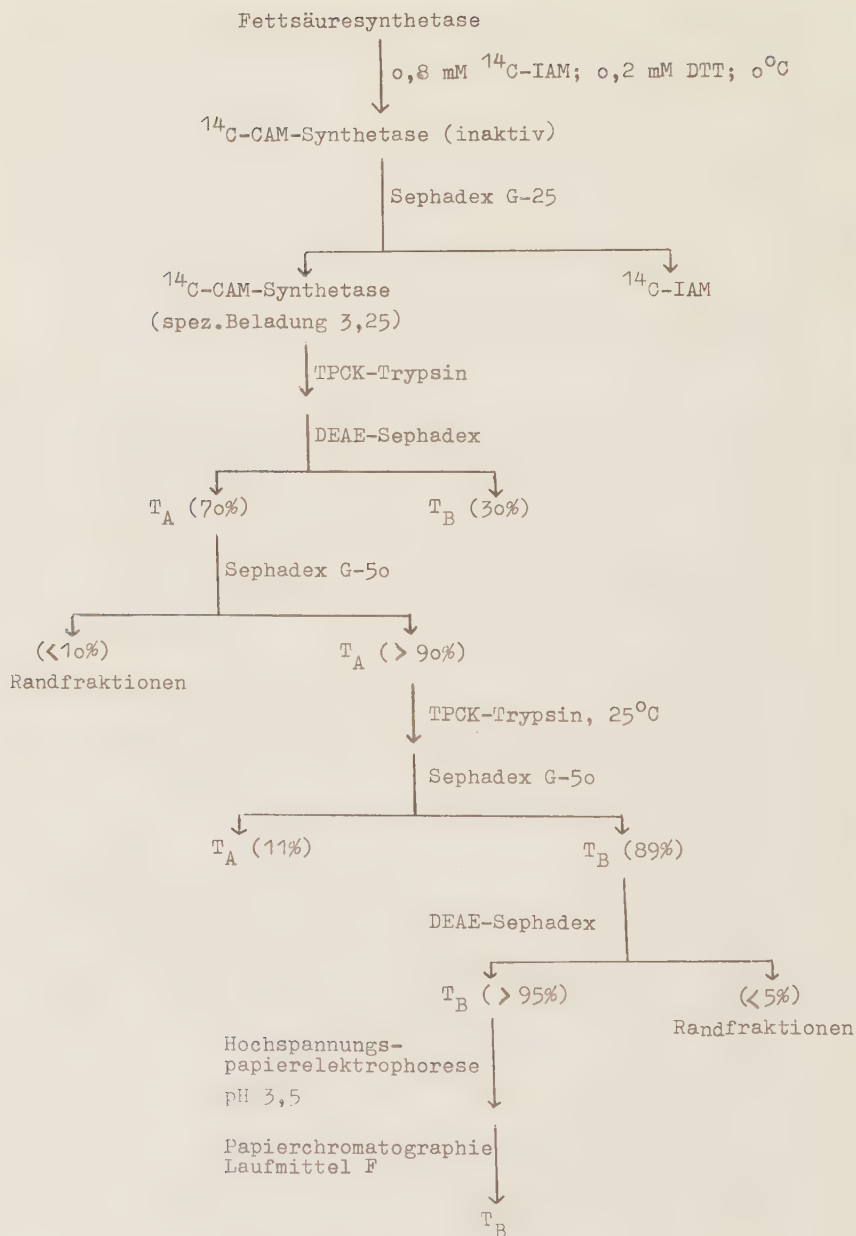


Abb.23 Schema der Reinigung des CAM-Peptids T_B

4.4.5 Verhalten von T_A und T_B bei der Hochspannungs-papier-elektrophorese

Als Methode zur weiteren Reinigung des Peptids T_B bot sich die Hochspannungselektrophorese auf Papier als Träger an; wir konnten hierbei die Erfahrungen von ZIEGENHORN (71) und SCHRECKENBACH (120) nutzen. Zur Verfügung stand uns ein nach dem von MICHL entwickelten Prinzip arbeitendes Gerät (126): hierbei wird die auf dem Papier freiwerdende Stromwärme abgeleitet, indem der - auf ein Plastikgestell gespannte - Papierbogen in einen mit Leichtbenzin (Varsol) gefüllten Tank eingestellt wird; das erhitzte, nach oben steigende Varsol wird dort wiederum durch mit Leitungswasser durchströmte Kühlschlangen abgekühlt.

Die exakten Bedingungen (Feuchtigkeitsgehalt des Papiers sowie die Temperatur, die auf dem Bogen von Stelle zu Stelle unterschiedlich sein kann) sind hierbei nicht völlig reproduzierbar. Wir ließen deshalb nach (127) Farbstoffgemische am Rande des Papierbogens mitlaufen; auch bei Schwankungen der absoluten Laufstrecken der Substanzen bleiben ihre relativen Wanderungsgeschwindigkeiten weitgehend unbeeinflusst. Auf Berechnung von elektrophoretischen Mobilitäten für die radioaktiven Peptide wurde verzichtet.

Für präparative Peptidreinigung war die MICHL-Apparatur besser geeignet als die ebenfalls vorhandene Hochspannungselektrophorese-Apparatur nach WIELAND und FLEIDERER, bei der die Kühlung des Papiers durch Anpressen an eine gekühlte Glasplatte erfolgt (128). Die Varsol-Tanks ermöglichen längere Laufstrecken (bis 110 cm) und liefern prinzipiell schärfer getrennte Peptidbanden als Geräte mit gekühlten Platten (129).

Zur Lokalisierung nicht-radioaktiver Peptide verwendeten wir Fluorescamin (130); mit diesem Reagens können weniger als 1 nMol Peptid durch gelbe Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

Peptid T_A verblieb, wie erwartet, sowohl bei pH 3,5 wie bei pH 6,5 am Start. T_B hingegen wanderte bei beiden untersuchten pH-Werten des Elektrophoresepuffers zur Kathode. Bei pH 6,5 war die Wanderungsstrecke sehr gering (vgl. Abb.24a) und entsprach etwa derjenigen des neutralen Markers ϵ -DNP-Lysin; man kann vermuten, daß die geringe Wanderung des T_B -Peptides auf endoosmotischer

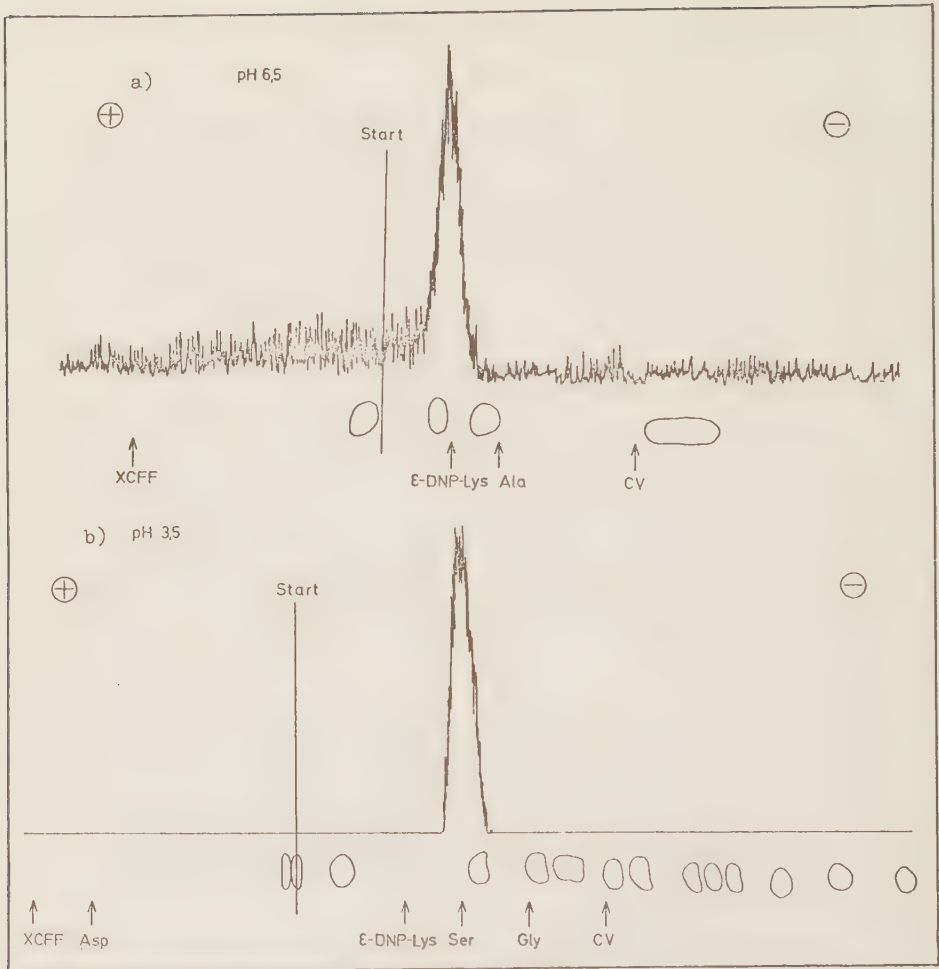


Abb.24 Hochspannungs-Papierelektrophorese von T_B. a) pH 6,5;
b) pH 3,5

Papier: Whatman 3 MM; 3300 V, 210 min (30 V/cm). Das verwendete T_B-Peptid war vorher wie in Abb.23 gereinigt worden. Die Position der Marker-Farbstoffe (XCFE = Xylencyanol FF; CV = Kristallviolett) und Referenz-Aminosäuren sind durch die Pfeilspitzen wiedergegeben; die Anfärbung der nicht-radioaktiven Begleitpeptide erfolgte mit Fluorescamin.

4.4.6 Verhalten von T_B bei der Papierchromatographie

Zur weiteren Reinigung von T_B bedienen wir uns der Papierchromatographie. Abb.26a-d zeigen, daß T_B in allen vier von ZIEGENHORN (71) beschriebenen Laufmitteln von zahlreichen nicht-radioaktiven Begleitpeptiden befreit werden kann. Zur Reinigung von T_B benutzten wir Whatman No.3 MM-Papier und Laufmittel F; die Ausbeute an T_B -Peptid betrug nach Elution mit 20%iger Essigsäure nur 125 nMol.

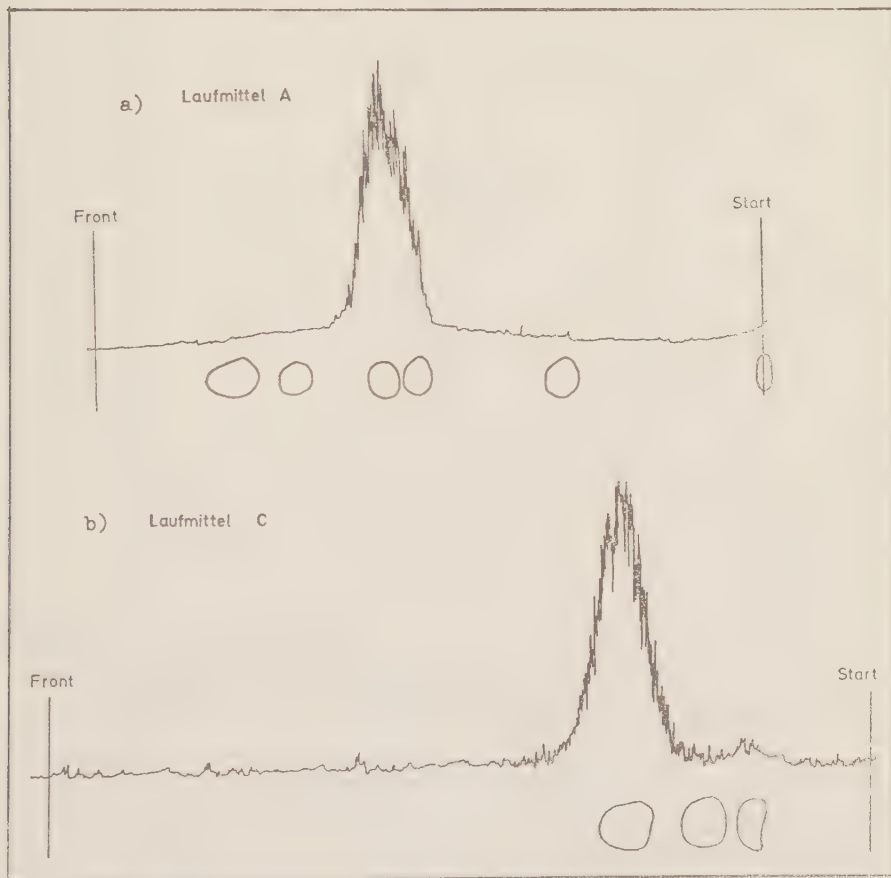


Abb.26 a,b Papierchromatographie von T_B (nach pH 3,5-Elektrophorese)
Laufmittel wie angegeben (vgl.Kap.7.1.4); Whatman No.3 MM-Papier; Peptidanfärbung mit Fluorescamin.

Ganzzahligkeit abweichende Werte.

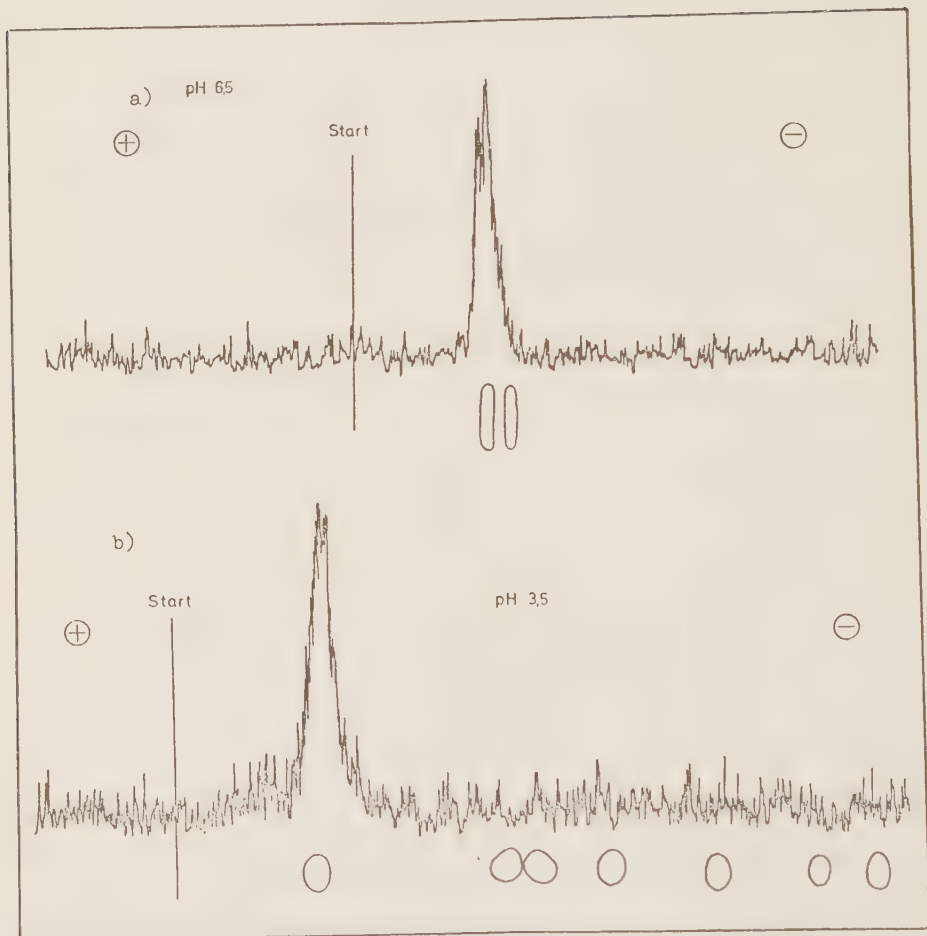


Abb.25 Hochspannungs-Papierelektrophorese von T_B . a) pH 6,5; das verwendete T_B -Peptid war vorher bei pH 3,5 elektrophoretisch gereinigt worden. b) pH 3,5; das verwendete T_B -Peptid war vorher bei pH 6,5 elektrophoretisch gereinigt worden.

Bedingungen und Peptidanfärbung wie Abb.24

4.4.6 Verhalten von T_B bei der Papierchromatographie

Zur weiteren Reinigung von T_B bedienen wir uns der Papierchromatographie. Abb.26a-d zeigen, daß T_B in allen vier von ZIEGENHORN (71) beschriebenen Laufmitteln von zahlreichen nicht-radioaktiven Begleitpeptiden befreit werden kann. Zur Reinigung von T_B benutzten wir Whatman No.3 MM-Papier und Laufmittel F; die Ausbeute an T_B -Peptid betrug nach Elution mit 20%iger Essigsäure nur 125 nMol.

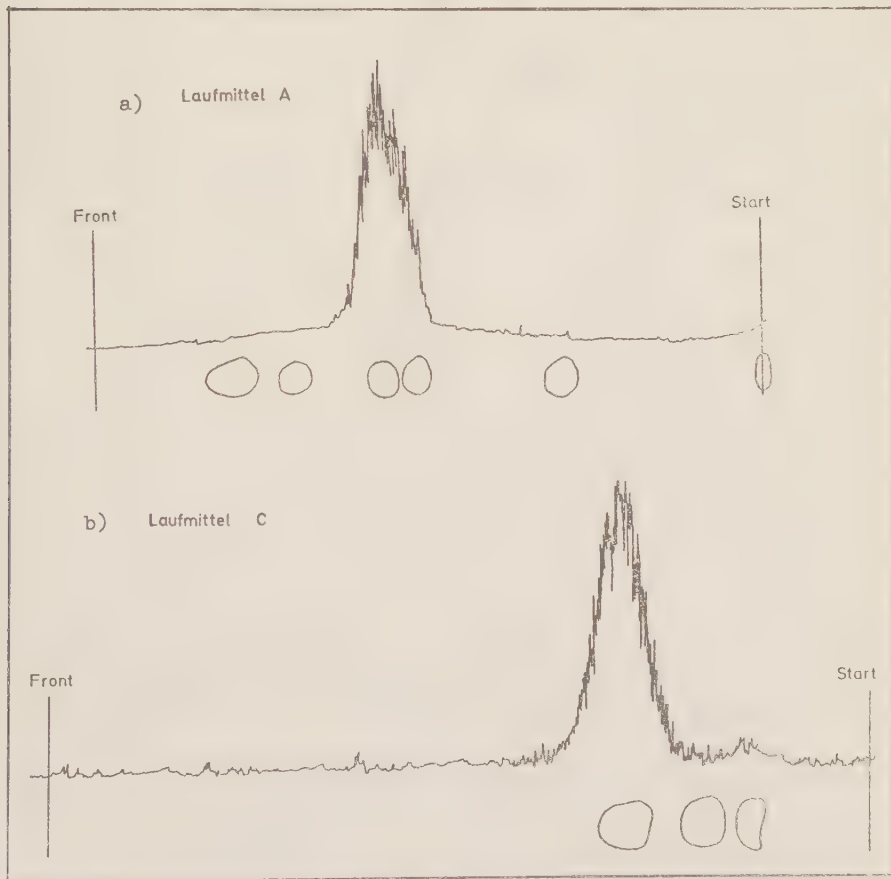


Abb.26 a,b Papierchromatographie von T_B (nach pH 3,5-Elektrophorese)
Laufmittel wie angegeben (vgl.Kap.7.1.4); Whatman No.3 MM-Papier; Peptidanfärbung mit Fluorescamin.

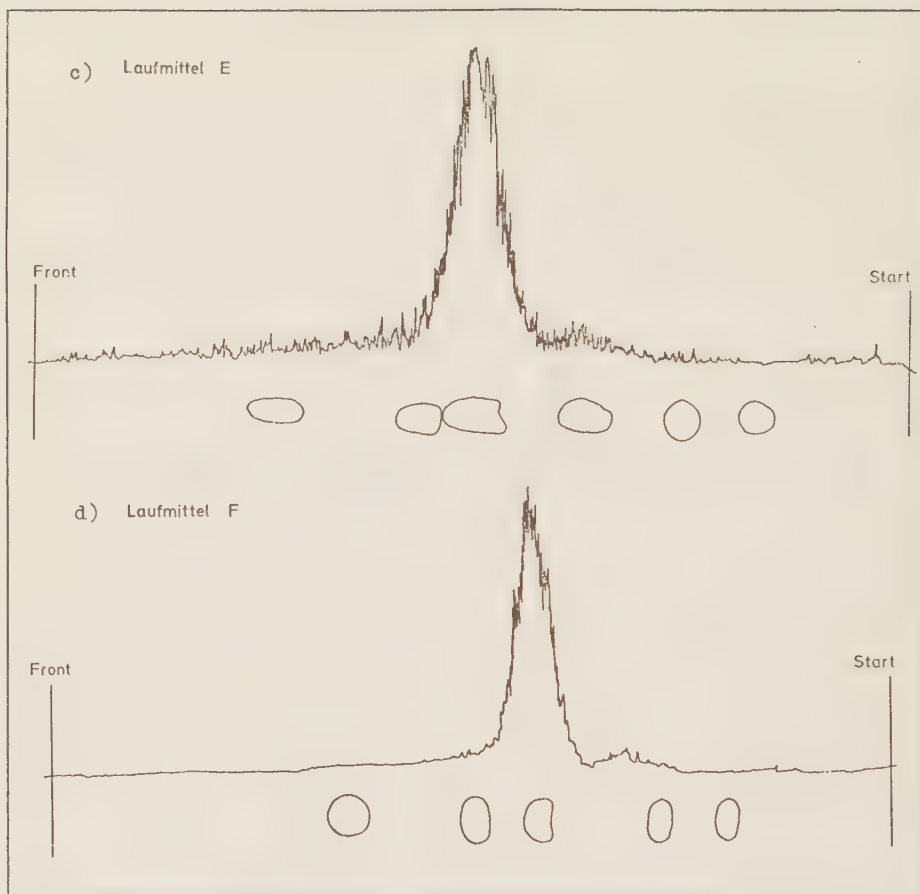


Abb.26 c,d Papierchromatographie von T_B (nach pH 3,5-Elektrophorese)
Laufmittel wie angegeben (vgl.Kap.7.1.4); Whatman
No.3 MM-Papier; Peptidanfärbung mit Fluorescamin

4.4.7 Diskussion zu Reinigung und Zusammensetzung von T_B

Aus der Aminosäureanalyse (Tab.11, Probe 1) ergab sich, daß nach Abb.23 gereinigtes T_B noch mit mindestens 10-20% Begleitpeptid verunreinigt war. Der Kunstgriff der "diagonalen" Chromatographie reichte also keineswegs aus, um nach insgesamt viermaliger Säulen-chromatographie, Hochspannungs-Papierelektrophorese und Papierchromatographie ein von Verunreinigungen völlig freies Peptid T_B zu erhalten; offenbar werden bei der Nachbehandlung mit Trypsin

Tabelle 11 Aminosäure-Zusammensetzung des Peptids T_B

Probe 1: gereinigt nach Abb.23; Probe 2: CAM-Synthetase wurde direkt zu T_B gespalten und das Peptid durch G-50- und DEAE-Sephadex-Chromatographie, Hochspannungselektrophorese (pH 3,5) und Papierchromatographie in den Laufmitteln F und A gereinigt.

Aminosäure	Aminosäurereste/Molekül T _B	
	Probe 1	Probe 2
SCMC	1,02	0,25 ^{a,b}
Asx	0,90	0,42 ^b
Thr	1,42	1,03
Ser	1,39	0,56
Glx	1,43	0,35
Pro	1,48	---- ^c
Gly	2,02	1,75
Ala	1,70	1,30
Cys	0	0
Val	0,94	1,03
Met	0,18	0,12
Ile	0,69	0,20
Leu	0,24	0,19
Tyr	0,57	0,12
Phe	0,05	0
NH ₃	---- ^d	ca.11
Lys	0,12	0,10
His	0,14	0
Trp	nicht best.	0,58
Arg	0,07	0,22

Anmerkungen: a) Der niedrige SCMC-Wert bei Probe 2 ist vermutlich auf partielle Cyclisierung zum (nicht mit Ninhydrin anfärbbaren) SCMC-Lactam zurückzuführen; Probe 2 mußte mehrere Wochen im Analysator-Puffer (pH 2,2) bei -20°C aufbewahrt werden. -

b) Bei Probe 2 wurde ein anderes Analysator-Programm angewendet als bei Probe 1; die Elutionsposition von SCMC (für das kein Standard vorhanden war) ist ungewiß, die Zuordnung von Asp und SCMC jedoch wahrscheinlich. - c) Bestimmung von Prolin war im für Probe 2 verwendeten Analysator-Programm nicht möglich. - d) NH₃-Menge nicht auswertbar (größer als bei der Systemempfindlichkeit aufzulösen).

Die Werte wurden nicht auf Hydrolyseverluste korrigiert. Die Berechnung der Zahl der Aminosäurereste pro Molekül T_B erfolgte an Hand der eingesetzten Radioaktivitätsmenge (die spezifische Radioaktivität des Peptids war bekannt).

Die Analysen wurden freundlicherweise von Herrn Dr.J.SPIESS, MPI für Biochemie, ausgeführt.

außer T_A noch zahlreiche nicht-radioaktive Peptide weiter zu Spaltstücken der Größe von T_B abgebaut. Angesichts der langen Inkubationsdauer und der sehr großen Proteasemenge ist dies durchaus nicht unverständlich. Wir stellten fest, daß T_B mindestens ebensogut von Verunreinigungen befreit werden kann, wenn CAM-Synthetase mit viel Trypsin direkt zu T_B gespalten wird und dieses dann durch G-50- und DEAE-Sephadex-Chromatographie, Hochspannungselektrophorese und mehrfache Papierchromatographie gereinigt wird (Tabelle 11, Probe 2); die Gesamtausbeuten, bezogen auf eingesetzte CAM-Synthetase, liegen hierbei in der gleichen Größenordnung wie bei dem in Abb. 23 dargestellten Reinigungsgang. Wegen der geringen Peptidmenge (Probe 1 125 nMol, Probe 2 138 nMol) war zu befürchten, daß bei weiterer Reinigung zu wenig Peptid verbleiben würde, als daß eine Sequenzanalyse möglich wäre. Wir hofften, daß die Aminosäuresequenz von T_B trotz der Gegenwart der restlichen Verunreinigungen bestimmt werden könnte.

Während des gesamten Peptidreinigungsganges fanden wir keine signifikante Abtrennung anderer radioaktiv markierter Peptide von T_A bzw. T_B . Dies unterstützt beweisend unser Ergebnis (Kap. 4.3), daß die drei CAM-Bindungsstellen der Synthetase sich in identischen Abschnitten der Primärstruktur befinden.

T_B -Peptid besitzt nach Tab. 11 neben dem durch den CAM-Rest radioaktiv markierten Cysteinrest kein weiteres Cystein. Wie in 4.3 dargestellt, ist hierdurch endgültig bewiesen, daß IAM unter den angewandten Bedingungen ausschließlich mit peripheren SH-Gruppen des Enzyms reagiert; es ist also die gleiche Cystein-Thiolgruppe, die während der Fettsäuresynthese den Acetyl- bzw. gesättigten Acylrest bindet sowie bei Umsetzung mit IAM den CAM-Rest aufnimmt.

Zunächst erstaunlich ist, daß T_B weder Lysin noch Arginin zu enthalten scheint; dies wäre jedoch bei einem durch Trypsin-Spaltung entstandenen Peptid zu erwarten gewesen. Da eine Verunreinigung der Protease durch Chymotrypsin auszuschließen ist (Kap. 4.2), vermuten wir, daß T_B durch Abbau des (vermutlich Lysin oder Arginin enthaltenden) T_A infolge Hydrolyse einer Peptidbindung durch Trypsin entsteht, die von einer anderen Aminosäure ausgeht. Dies könnte SCAMC sein: die Spaltung von SCAMC-Peptidylbindungen durch Trypsin wurde beschrieben (132); in diesem Fall müßte der radioaktiv markierte Rest am Carboxylende von T_B stehen. Möglich wäre auch Spaltung einer chymotrypsin-sensitiven Peptid-

bindung ("inhärente" Aktivität auch von hochgereinigtem Trypsin gegen die Modellsubstrate des Chymotrypsins: (133)). "Unspezifische" Lösung von Peptidbindungen durch Trypsin wurde gelegentlich berichtet (134); auch ZIEGENHORN erhielt ein tryptisches Spaltpeptid, das weder Lysin noch Arginin enthielt und nicht vom Carboxyl-Ende einer der Polypeptidketten der Synthetase herzustammen schien (71, 135). Bei der hohen, von uns verwendeten Trypsinkonzentration kann eine derartige Spaltung "eigentlich trypsin-resistenter" Peptidbindungen nicht ausgeschlossen werden.

Eine andere Möglichkeit wäre die Annahme, daß T_B dem Carboxyl-Ende der Polypeptidkette A der Synthetase entstammt. Wir haben keine Beweise für oder gegen diese Hypothese, erachten sie aber nicht als allzu wahrscheinlich.

Das Verhalten von T_B an Ionenaustauschern und bei der Elektrophorese spricht dagegen, daß das Peptid über Seitenketten mit freien Carboxylatgruppen verfügt. Sofern T_B also Asx- bzw. Glx-Reste besitzt (Tab.11), erscheint ihr Vorliegen als Asn bzw. Gln wahrscheinlich.

Die von uns gefundene Zusammensetzung von T_B ist möglicherweise vereinbar mit der von OESTERHELT angegebenen Aminosäureanalyse von T_A (61). Es ist jedoch anzunehmen, daß OESTERHELTS T_A -Peptid noch sehr stark verunreinigt war und daß die Analyse eine nicht vorhandene Einheitlichkeit vortäuschte (in (61) wird nicht angegeben, wieviel SCMG im T_A -Peptid vorhanden war; OESTERHELT vermutete ja, daß der CAM-Rest nicht an Cystein gebunden sei).

Durchaus möglich hingegen erscheint, daß das von SCHRECKENBACH isolierte Palmitoyl-Peptid T_3 (enthaltend ca. 27 Aminosäurereste (120)) mit T_A identisch ist; nach (120) enthielt es zwar kein Threonin, dies könnte jedoch ein Analysenfehler sein. Markierung der peripheren Sh-Gruppe mit radioaktivem Palmitat besitzt zwar alle Nachteile der Acetyl-Markierung (vgl. Kap.4.3), ist jedoch wegen der Hydrophobie der nach Trypsin-Spaltung entstehenden Palmitoyl-Peptide (die sich hierdurch leicht von nicht-acylierten, hydrophilen Spaltpeptiden abtrennen lassen (120)) ein grundsätzlich vielversprechender Weg zur Gewinnung des T_A -Peptids. Prinzipiell ist es möglich, thioesterartig gebundene Acylreste (etwa nach Vorreinigung des Palmitoyl-Peptids) durch den CAM-Rest zu verdrängen (136); dies bietet wiederum die Möglichkeit zu einem "diagonalen" Verfahren der Peptidreinigung.

4.5 Die Sequenz des tryptischen CAM-Peptids T_B

4.5.1 Methodisches

Beste Methode zur Sequenzanalyse von Peptiden ist der EDMAN-Abbau (137); hierbei werden die Aminosäurereste schrittweise, beginnend vom Aminoende des Peptids, abgespalten und können entweder direkt als Phenylthiohydantoine (PTH-Aminosäuren) oder nach Hydrolyse als freie Aminosäuren identifiziert werden. Prinzipiell möglich sind auch subtraktive Verfahren, bei denen nach Abspaltung der jeweils N-terminalen Aminosäure die neue Aminoendgruppe in einer Substanzprobe etwa mit Hilfe von Dansylchlorid ermittelt wird (138); Nachteil dieses Verfahrens ist, daß auf jeder Stufe des Abbaus ein Teil der Substanz zur Endgruppenbestimmung entnommen werden muß.

In der Literatur beschriebene Modifikationen des ursprünglich von EDMAN angegebenen Verfahrens (139) erlauben die Sequenzierung von Peptiden im Nanomol-Maßstab (120,140). Wir führten den EDMAN-Abbau exakt in der von SCHRECKENBACH beschriebenen Weise durch (vgl.Kap.7.4.9). Zur Identifizierung der PTH-Aminosäuren verwendeten wir jedoch nicht die in (120) benutzte zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf Polyamidfolien (141), bei der die Lokalisierung der Probe durch Löschung eines dem ersten Laufmittel zugesetzten Fluoreszenzindikators erfolgt. Folgende Gründe ließen uns die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-Folien zur Identifizierung der PTH-Aminosäuren als überlegen erscheinen:

- 1. Kieselgel-Folien erlauben eine größere Auswahl von Laufmittelsystemen und ermöglichen daher eine eindeutige Identifizierung aller Aminosäurereste;
- 2. Vergleichsmischungen authentischer PTH-Aminosäuren können auf der gleichen Seite der Folie neben der Probe aufgetragen werden;
- 3. Wegen der höheren Kapazität der Kieselgel-Folien ist die Gefahr der Überladung durch zu große Substanzmengen wie auch der Beschädigung der Schicht durch Lösungsmittel geringer;
- 4. Die PTH-Aminosäuren können in Dichloräthan aufgenommen werden; sie sind in diesem Solvens erheblich besser löslich als in Methanol, das in (120) wegen der Empfindlichkeit der Polyamid-Schicht gegen Dichloräthan verwendet werden mußte.

Die Identifizierung der PTH-Aminosäuren auf Kieselgel ist im Subnanomol-Maßstab mit Hilfe des Calcein-PdCl₂-Sprühreagens (142,143)

möglich. Eindeutig lokalisierbar sind hierbei weniger als 0,5 nMol PTH-Aminosäure (Ausnahme: PTH-Prolin mindestens ca. 1,5 nMol/Fleck). Das Reagens ist spezifisch für Schwefelverbindungen; einziges ebenfalls angefärbtes Nebenprodukt ist Diphenylthioharnstoff (DPTU), das beim Abbau stets auftritt.

Zusätzlich kann bei der ohnedies erforderlichen Verwendung von Kieselgel-Schichten mit Fluoreszenzindikator die Löschung dieser Fluoreszenz (254 nm) durch die PTH-Aminosäuren zur Lokalisierung herangezogen werden. Die Empfindlichkeit beträgt etwa 1-5 nMol/Fleck (137); die Methode ist vergleichsweise unspezifisch. Der Jod/Azid-Spray (137) ist prinzipiell beliebig spezifisch, jedoch besitzt das Verfahren noch geringere Spezifität; Lokalisierung der PTH-Aminosäuren durch Fluoreszenzlöschung von Butyl-PBD auf Polyamid zeigt etwa gleiche Empfindlichkeit wie das Calcein/PdCl₂-Sprühreagens (120), ist jedoch ebenfalls weniger spezifisch, da fluoreszenz-löschende Verunreinigungen miterfaßt werden.

Der etwas größere Zeitaufwand bei der Kieselgel-Dünnschichtchromatographie (1-2 h gegenüber 0,5 h für die Polyamid-Methode) fällt bei manueller Durchführung des EDMAN-Abbaus nicht ins Gewicht.

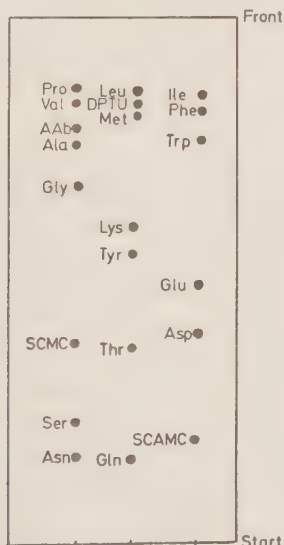


Abb. 27 Dünnschicht-chromatographische Trennung von PTH-Aminosäuren auf Kieselgel

Laufmittel I. - AAb = α -Amino-buttersäure

Wir verwendeten zur Chromatographie Laufmittel I (144), in dem Trennung aller ätherlöslichen PTH-Aminosäuren außer Asn/Gln, Val/Thr/DPTU und in einigen Fällen Gly/Lys möglich ist (Abb.27). Verbleibende Zweifel wurden geklärt durch Chromatographie im System V (für unpolare Reste) bzw. V + IV (für polare Reste)(145). Zur zusätzlichen Identifizierung sowie insbesondere zur Erkennung von Valin-Resten, deren PTH-Derivat in beiden Systemen gleiches Verhalten zeigt wie DPTU, spalteten wir sodann die PTH-Aminosäuren mit Jodwasserstoffsäure (146), setzten die erhaltenen freien Aminosäuren mit Dansylchlorid um und identifizierten die Dansyl-Aminosäuren durch Dünnschichtchromatographie auf Polyamidfolien.

4.5.2 Sequenzierung von T_B

Erste Sequenzierungsversuche erbrachten über drei Abbauschritte keine Ergebnisse. Dieser wenig hoffnungsvolle Befund ließ die Vermutung aufkommen, das Aminoende von T_B sei möglicherweise blockiert und EDMAN-Abbau somit unmöglich; dies wäre durch verschiedene Umstände denkbar (N-Acetylierung (147), β -Aspartyl-Bindungen (148), Cyclisierung von Glu- oder Gln-Resten (149) oder von SCAMC (Kap.3). Gegen eine Blockierung der Aminoendgruppe sprach jedoch die gute Anführbarkeit von T_B mit Fluorescamin, das ja mit der freien Aminogruppe in Reaktion treten sollte (130).

Bei Behandlung des Peptids mit Pyrrolidonyl-Leptidase sollte ein eventuell am Amino-Ende vorhandener Pyroglutamylrest abgespalten und eine neue, freie Aminoendgruppe gebildet werden. Wie wir fanden, änderte T_B nach Behandlung mit Pyrrolidonyl-Peptidase zwar seine chromatographischen Eigenschaften geringfügig, nach Elution vom Papier war jedoch wiederum keine Aminoendgruppe nachzuweisen.

Eine Erklärung für unsere zunächst erfolglosen Sequenzierungsversuche erbrachte EDMAN-Abbau von 25 nMol T_B (Probe 2, Tab.11), bei dem die nach HJ-Spaltung der PTH-Aminosäuren freigesetzten Aminosäuren als Dansyl-Derivate identifiziert wurden (Tabelle 12). Rest 1 ergab zwar sichtbare Flecken auf den Chromatogrammen sowohl als PTH- wie als Dansyl-Aminosäure, die jedoch mit keiner der als Referenz eingesetzten Aminosäuren übereinstimmten; wir nehmen vorläufig an, daß es sich um ein (noch nicht identifiziertes) Umwandlungsprodukt einer empfindlichen Aminosäure (Trp, Thr ?) handelt. Rest 2 erwies sich als Prolin und war wegen der geringen Empfindlichkeit

des Sprühreagens für gerade diese PTH-Aminosäure nicht sichtbar gewesen, während Rest 3 als Valin identifiziert wurde; wie erwähnt zeigt PTH-Valin in allen verwendeten Laufmitteln gleiches dünnschichtchromatographisches Verhalten wie DPTU und war somit ebenfalls erst nach Hydrolyse und Dansylierung bestimmbar.

Der weitere Abbau von T_B war problemlos bis Rest 6 möglich; bei diesem handelte es sich um SCMC, das als PTH-Aminosäure, als freie Aminosäure (nach Dansylierung) und durch die enthaltene Radioaktivität identifiziert wurde.

Weitere Abbauprobversuche über vier Stufen ergaben keinerlei lokalisierbare Produkte. Tabelle 12 zeigt den Ablauf der Sequenzierung, die mit den einzelnen Methoden bestimmten Aminosäurereste und die daraus resultierende Sequenz. Ein zweiter Abbauprobversuch erbrachte exakt übereinstimmende Resultate.

Tabelle 12 Sequenzierung von T_B

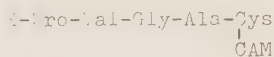
Rest n. ^a	PTH-Aminosäure (IM I und V+IV)	Dansyl- _n aminosäure	Sequenz
1	nicht identifizierbar	nicht identifizierbar	X
2	kein Fleck sichtbar	Pro	Pro
3	kein Fleck sichtbar	Val (+ Pro)	Val
4	Gly	Gly	Gly
5	Ala	Ala + Gly	Ala
6	SCMC	SCMC, Gly, Ala	SCMC
7 ff.	kein neuer Fleck sichtbar	kein neuer Fleck sichtbar	?

a: gezählt vom N-Terminus in der Reihenfolge des EDMAN-Abbaus. -
b: nach Hydrolyse der PTH-Aminosäuren mit HJ, Umsetzung mit Dansylchlorid und Polyamid-Dünnschichtchromatographie.

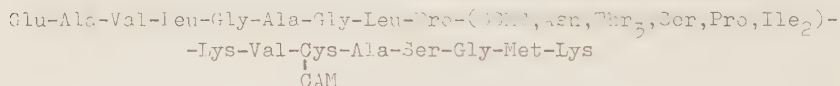
Das als Verunreinigung anwesende Peptidmaterial (vgl.Tab.11) störte die Eindeutigkeit der Identifizierung in keiner Weise.

4.5.3 Diskussion zu 4.5 und Vergleich mit Thiolase

Die Aminosäureanalyse der zur Sequenzierung verwendeten Probe (Tab.11) erlaubt keine eindeutige Entscheidung, ob Peptid T_B bereits vollständig sequenziert wurde (der bislang nicht identifizierte Rest 1 müßte dann ein Threonin sein), oder ob T_B zusätzlich zu den ermittelten Resten noch weiteres Gly, Trp und Ser enthält. Sowohl die Natur der amino-terminalen Aminosäure wie die Sequenz auf der Carboxyl-Seite des SCAMC werden weiterer Untersuchungen bedürfen. Vorerst kann folgende Teilsequenz für T_B angegeben werden:



Sie erlaubt den erwünschten Vergleich mit dem aktiven Zentrum der Thiolase nur in sehr eingeschränktem Maße; Untersuchungen von GEHRING und HARRIS (116,117) ergaben folgende Primärstruktur in der Umgebung des aktiven Cysteins der Thiolase:



Außer dem funktionellen Cysteinrest sind somit bislang nur zwei Aminosäurereste vergleichbar. Während in der Thiolase für die beiden, auf der Amino-Seite benachbarten Reste die Sequenz Lys-Val-Cys gefunden wurde, bestimmten wir für die kondensierende Enzymkomponente der Fettsäuresynthetase die Reihenfolge Gly-Ala-Cys.

Vom Standpunkt der Proteinbiosynthese, aus gesehen können Ala und Val als ähnlich bezeichnet werden (durch Austausch einer Base ineinander überführbar), während Lys und Gly keine Ähnlichkeit aufweisen (Austausch mindestens zweier Basen erforderlich). Die vergleichbare Sequenzlänge ist jedoch vorläufig viel zu gering, um weitergehende Aussagen über eine eventuelle Verwandtschaft der Sequenzen der aktiven Zentren in den beiden Enzymen machen zu können. Sollte der CAM-markierte Cysteinrest tatsächlich in T_B N-terminal sein, so wird eine relevante Vergleichsmöglichkeit erst nach Reinigung und Sequenzierung von T_A möglich sein.

5

Lokalisierung der peripheren SH-Gruppe auf der Polypeptidkette A des Multienzymkomplexes

5.1 Allgemeines

Genetische Untersuchungen, die im Arbeitskreis von SCHWEIZER durchgeführt wurden (151-154), ergaben, daß sämtliche Teilaktivitäten der Fettsäuresynthetase durch nur zwei Genloci codiert werden. Weiter wurde gefunden, daß diese beiden Genloci für jeweils nur eine einzige, polyfunktionelle Peptidkette codieren (97, 155-157); jede der beiden Ketten enthält demnach die aktiven Zentren mehrerer Teilenzyme. Umfangreiche genetische Analysen ermöglichten es SCHWEIZER, die Verteilung der einzelnen Teilenzyme auf die durch die Genloci fas 2 bzw. fas 1 codierten Polypeptidketten A und B anzugeben (Abb.28):

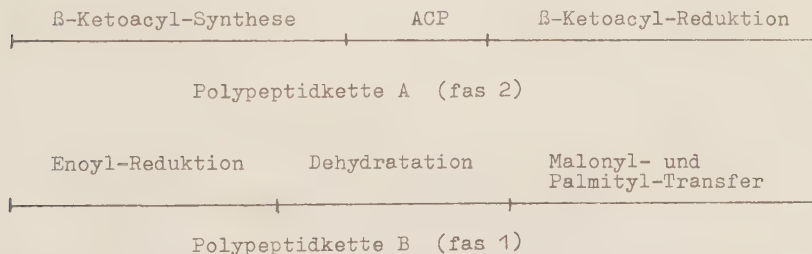


Abb.28 Verteilung der Teilaktivitäten auf die Synthetase-Untereinheiten A und B nach SCHWEIZER (158)

In der Folge gelang es in SCHWEIZERS Labor, die beiden Polypeptidketten A und B mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analytisch voneinander zu trennen (97); ihre Molekulargewichte wurden zu 185000 bzw. 180000 Dalton angegeben. In wechselndem Ausmaß wurde eine weitere Komponente C (Molekulargewicht 177000 Dalton) gefunden; SCHWEIZER nimmt an, daß C aus A durch spezifische proteolytische Spaltung gebildet wird. Untereinheiten ähnlichen Molekulargewichts waren von SUMPER (65,159) bei Spaltung der Synthetase durch mehrmaliges Einfrieren in LiCl-Lösung erhalten worden. Auch bei der Untersuchung von Fettsäuresynthetase-

Komplexen aus tierischem Gewebe wurden Untereinheiten mit Molekulargewichten ähnlicher Größenordnung erhalten (160-162); auch hier wurde neuerdings über das Vorliegen polyfunktioneller Peptidketten berichtet (163,164).

Es war nun von Interesse, die auf der Basis genetischer Experimente getroffene Zuordnung der Synthetase-Teilaktivitäten zu den Polypeptidketten A bzw. B mit chemischen Mitteln zu überprüfen. Nach Züchtung von Hefe auf ^{14}C -Pantothensäure enthaltendem Medium war es SCHWEIZER möglich gewesen, im ACP radioaktiv markierte Synthetase anzureichern; er konnte zeigen, daß die Radioaktivität sich in Peptidkette A befand (97). Das ACP der Hefe-Fettsäuresynthetase ist demnach kovalent mit den anderen Teilenzymen der Kette A verbunden und wird durch den Genlocus *fas 2* codiert.

In unserem Arbeitskreis gelang es in jüngster Zeit, mit enzymchemischen Methoden die Lokalisierung der Acetyl-Transferase-Komponente auf Polypeptidkette B nachzuweisen (165).

5.2 Lokalisierung der peripheren SH-Gruppe (166)

Die Möglichkeit, die periphere SH-Gruppe und somit das aktive Zentrum des kondensierenden Teilenzym in spezifischer Weise mit IAM radioaktiv zu markieren, erlaubte uns nunmehr eine Lokalisierung dieser Teilaktivität mit chemischen Mitteln. Nach den Ergebnissen der genetischen Arbeiten SCHWEIZERS war zu fordern, daß die CAM-Bindungsstelle der gleichen Polypeptidkette angehören mußte wie das 4'-Phosphopantethein des ACP, d.h. der A-Kette (bzw. der C-Kette bei solchen Hefe-Mutanten-Enzymen, bei denen A partiell gespalten war).

Für diesen Versuch, den wir in Zusammenarbeit mit Frau H.CASTORPH und Herrn Prof.Dr.E.SCHWEIZER, Universität Würzburg, durchführten, war es erforderlich, Synthetase zu verwenden, die unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen aus frisch geernteter Hefe unter Vorsichtsmaßnahmen gegen proteolytischen Abbau angereichert worden war; bei Untersuchung von Fettsäuresynthetase aus käuflicher Bäckerhefe wurden neben A,B und ggf.C in der SDS-Gelelektrophorese

weitere Proteinbanden (wohl Abbauprodukte) gefunden (167).

Um die Spezifität der Beladung mit ^{14}C -CAM-Resten nach Umsetzung der Synthetase mit ^{14}C -IAM auch für die zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese benutzten Enzympräparate sicherzustellen, untersuchten wir das Gemisch der nach Verdauung der CAM-Synthetase mit Trypsin erhaltenen Spaltpeptide durch Chromatographie an Sephadex G-50 (vgl. Kap.4). Abbildung 29 zeigt, daß hauptsächlich T_B mit nur geringen Anteilen T_A gefunden wurde; dies ist nicht überraschend, da die sehr geringen verfügbaren Proteinmengen mit einem großen Trypsin-Überschuß verdaut worden waren. Andere Spaltstücke als T_A und T_B traten, wie erwartet, nicht auf; für alle untersuchten Mutanten-Enzyme wurde das gleiche Ergebnis erhalten.

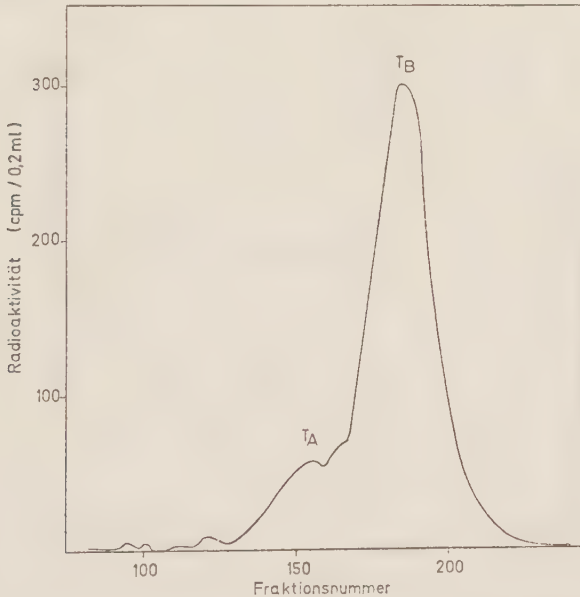


Abb.29 Sephadex G-50-Chromatographie des tryptischen Hydrolysats von ^{14}C -CAM-Synthetase (aus Mutante fas 2-349)

Beladungs- und Spaltungsbedingungen vgl. Kap.7.5.1. Chromatographie: Säule 1,6 x 87 cm; Eluant: 50% Essigsäure; Fraktionsvolumen 0,22 ml. 0,2 ml jeder zweiten Fraktion wurden auf Radioaktivität geprüft.

Die im Arbeitskreis von Prof. SCHWEIZER durchgeführte Zentrifugation im Sucrose-Dichtegradienten zeigte, daß die radioaktive Markierung ausschließlich mit dem Synthetase-Protein, nicht jedoch etwa mit Material geringeren Molekulargewichts assoziiert war (Abb.30).

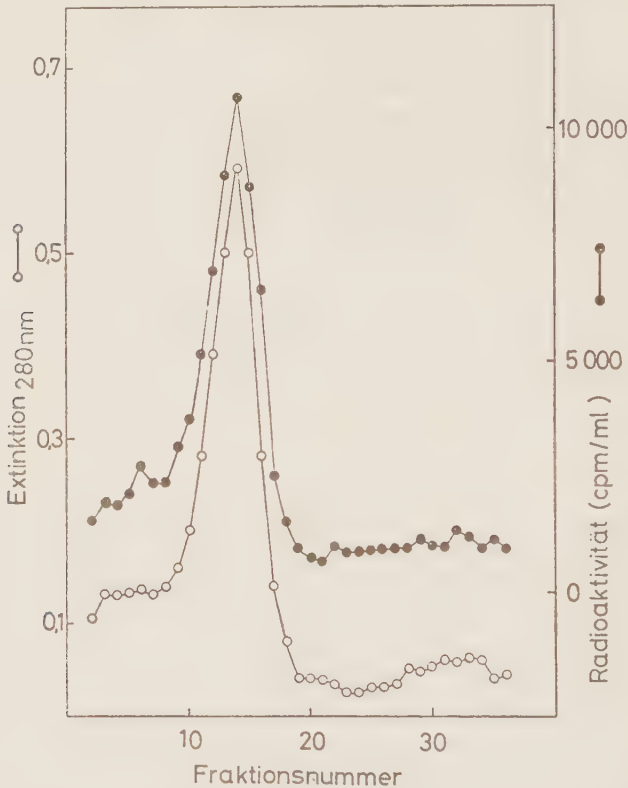


Abb.30 Sedimentations-Profil von ^{14}C -CAM-Synthetase im Sucrose-Dichtegradienten (Mutante fas 1-160)

Bedingungen der Zentrifugation vgl. (97)

Bei der analytischen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese fanden wir nach Anfärben der Gele mit Coomassie-Brilliantblau G 250 bei allen untersuchten Enzympräparaten lediglich die Proteinbanden A und B; Komponente C lag nur spurenweise vor (Abb.31, unterer Teil). Nach Zerteilen der Gele in dünne Scheibchen wurde die Radioaktivitäts-

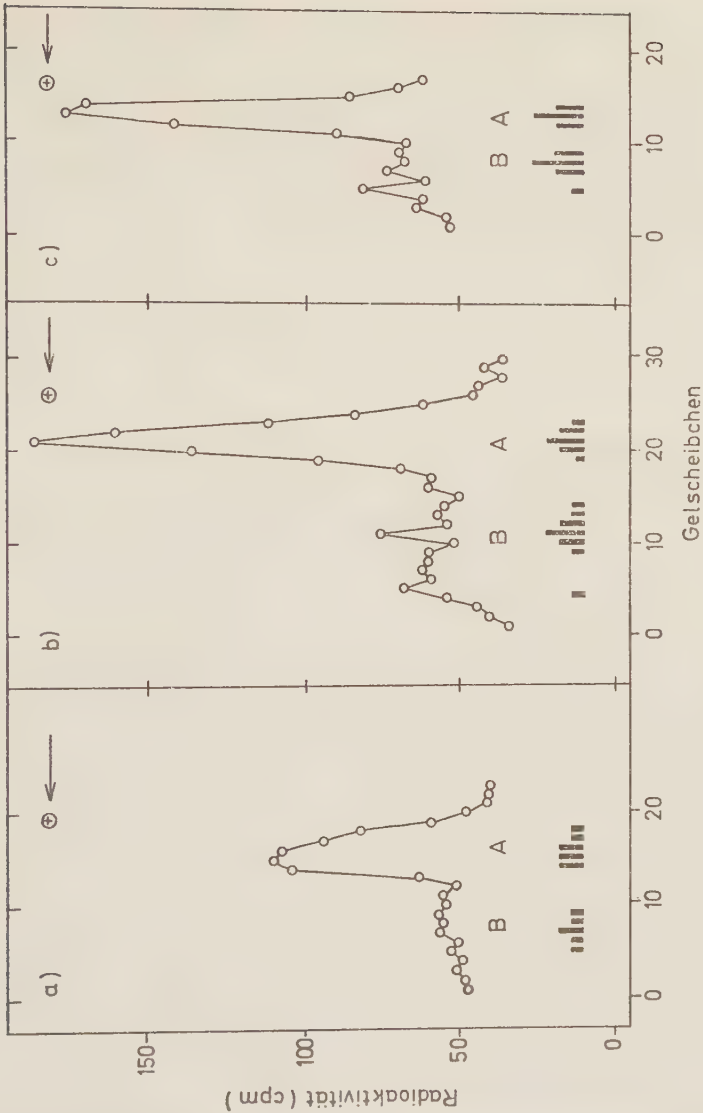


Abb.31 Protein- und Radioaktivitätsverteilung bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von ^{14}C -CAM-Synthetase

a) Wildtyp; b) fas 1-266; c) fas 2-349. - Die schwarzen Balken geben die relative Färbungsintensität der Gelscheibchen mit Coomassie-Brilliantblau G 250 an und stellen somit ein Maß für die Proteinmenge dar.

verteilung gemessen; wie Abb.31 (obere Kurve) erkennen läßt, war der radioaktive CAM-Rest in allen untersuchten Fällen ausschließlich an die langsamer wandernde Bande A gebunden (ggf. in geringen Anteilen auch an C). Es ist hierdurch bewiesen, daß die CAM-Bindungsstelle Bestandteil der gleichen Polypeptidkette ist wie das 4'-Phosphopantethein; in Übereinstimmung mit der genetisch getroffenen Zuordnung sind demnach ACP und kondensierende Enzymkomponente auf der größeren Untereinheit A lokalisiert.

5.3 Diskussion zu 5.2

SCHWEIZERS genetische Untersuchungen hatten große Bedeutung für die gegenwärtigen Vorstellungen vom molekularen Aufbau des Multienzymkomplexes Fettsäuresynthetase aus Hefe. Während frühere Experimente, die zur Aufklärung der Zusammensetzung der Synthetase aus Untereinheiten durchgeführt worden waren, verwirrende und scheinbar widersprüchliche Ergebnisse geliefert hatten (44, 54, 55, 63, 65, 66, 68, 168, 169), scheint jetzt erwiesen, daß das Enzym aus nur zwei verschiedenen, multifunktionellen Polypeptidketten aufgebaut ist. Unsere hier dargestellten Ergebnisse liefern eine weitere Stütze dieser Vorstellung: es gelang erstmals, mit Hilfe einer chemischen Modifikation des gereinigten Enzyms, deren Wirkung proteinchemisch gut untersucht war, eine Enzymkomponente spezifisch zu markieren und die aus genetischen Experimenten gewonnene Folgerung hinsichtlich der Lokalisierung dieser Teilaktivität zu bestätigen.

In der Zwischenzeit wurden auch im Arbeitskreis von PORTER Versuche unternommen, die zum Ziele hatten, die Verteilung der (von PORTER und Mitarbeitern durch Affinitätschromatographie getrennten) zwei Untereinheiten der Fettsäuresynthetase aus Taubenleber zu ermitteln. Zur Lokalisierung von ACP und kondensierender Enzymkomponente bediente man sich hierbei der Beladung mit radioaktiven Acetylresten. Nach PORTERS Angaben (163) befinden sich beim Taubenleber-Enzym die "A₂-Bindungsstelle" (zentrale SH-Gruppe) und die "B₂-Bindungsstelle" (periphere SH-Gruppe) nicht auf derselben Untereinheit des Multienzymkomplexes. PORTERS Ergebnisse, soweit

sie die periphere SH-Gruppe betreffen, scheinen allerdings zunächst nicht restlos überzeugend (Beladung mit Acetyl-ACP aus Taubenleber nach Spaltung des Enzyms in Untereinheiten ohne Prüfung auf Spezifität der Beladung; keine Prüfung der Acetyl-Bindung auf PAS-Stabilität; Untersuchung peptischer Spaltpeptide durch Papierelektrophorese bei nur einem pH-Wert). Es bleibt daher abzuwarten, ob die Teilaktivitäten in der Synthetase aus Taubenleber tatsächlich in anderer Weise auf die beiden Polypeptidketten verteilt sind als im Hefe-Enzym. Angesichts der naheliegenden Vorstellungen über die molekulare Evolution derartiger multifunktionaler Polypeptidketten durch Genverschmelzung erschiene dies vorerst durchaus überraschend.

5.4 Zur Möglichkeit der Half-site-Reaktivität von Fettsäuresynthetase

5.4.1 Allgemeines

Die Molekulargewichte der Untereinheiten A und B sowie die etwa gleich starke Anfärbung der Proteinbanden bei der Auswertung der SDS-Gele legen die Annahme nahe, daß der Synthetase-Komplex die Zusammensetzung A_6B_6 besitzt (158,166). Messungen des Flavin- und Pantethein-Gehalts der Synthetase (44,170) deuteten zwar eher auf einen pentameren Aufbau des Komplexes hin; da jedoch pentamere Enzyme bislang nicht gefunden wurden und der Aufbau von oligomeren Proteinen aus einer geraden Zahl von Untereinheiten als wesentlich wahrscheinlicher anzusehen ist (171), kann man vermuten, daß die niedrigeren Flavin- und Pantethein-Werte möglicherweise auf partiellen Verlusten dieser Wirkungsgruppen (in vivo oder z.B. während der Enzymanreicherung) beruhen. Tatsächlich fand ELOVSON im Fettsäuresynthetase-Komplex aus *Neurospora crassa*, der demjenigen der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) sehr ähnlich zu sein scheint, bei einem Molekulargewicht von 2,3 Millionen Dalton einen Gehalt von 6 Mol 4'-Phosphopantethein pro Mol Enzym; durch SDS-Gelelektrophorese ließ sich das Protein in zwei Banden mit Molekulargewichten von ca. 200000 aufspalten, von denen die langsamer wandernde das Phosphopantethein enthielt (46).

Im Widerspruch zur Annahme einer hexameren Komplexstruktur scheint zunächst die von HAGEN gefundene (68) und von OESTERHELT (61) und von uns (vgl. Kap.2.4) bestätigte Stöchiometrie der Carboxamidomethylierung zu stehen. Tatsächlich sah HAGEN die vollständige Synthetase-Hemmung nach Einbau von 3 CAM-Resten als Beweis für trimeren Aufbau der Synthetase an.

Zur Erklärung der Stöchiometrie der IAM-Hemmung sind grundsätzlich zwei Möglichkeiten denkbar:

- 1. Alle verwendeten Enzympräparate enthielten ca. 50% nicht-aktives Protein (entweder verunreinigende Fremdproteine oder inaktive Synthetase, die nicht mehr mit IAM reagiert). Wir können diese Möglichkeit nicht völlig ausschließen. Die Tatsache jedoch, daß die gleiche Grenzbeladung (ca. 3 CAM/Synthetase) von verschiedenen Bearbeitern und mit Enzympräparaten sehr unterschiedlicher spezifischer Aktivität (ca. 340 bis ca. 2500 mE/mg) übereinstimmend gefunden wurde, scheint uns gegen diese Annahme zu sprechen; man sollte sowohl im Falle von Protein-Verunreinigungen wie auch bei Inaktivierung des Enzyms (z.B. durch irgendwie gear-tete Modifikation der peripheren SH-Gruppe) wechselnde Grenzbeladungen erwarten, die zudem einen Zusammenhang mit der spezifischen Aktivität der Enzympräparate zeigen sollten (sofern die Kondensationsreaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, vgl. Kap.2.2). Dies ist jedoch nicht der Fall.

- 2. Der Einbau von gerade 3 CAM-Resten pro hexamerer Synthetase-Molekül ist nicht zufällig, sondern steht mit funktionellen Eigenschaften des Multienzymkomplexes im Zusammenhang.

Es ist bemerkenswert, daß in zunehmendem Maße über Enzyme berichtet wird, die aus einer geraden Zahl (2n) identischer Unter-einheiten aufgebaut sind, jedoch nur halb so viele (n) Mol Substrat, Substratanalogon oder Hemmstoff pro Mol Enzym binden; dieses Phänomen wurde als "Half-site-Reaktivität" bezeichnet (172-175, 200). Zu den Enzymen, für die Half-site-Reaktivität beobachtet wurde, zählen CTP-Synthetase (172), mitochondriale Malat-Dehydrogenase (176), Alkohol-Dehydrogenase (177), Transaldolase (178), Glycerin-aldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (179), alkalische Phosphatase (180), Glutamat-Dehydrogenase (181), verschiedene Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (182, 183), Steroid-Isomerase (184) und andere.

Über Vorteile derartiger Half-site-Reaktivität wurde sehr weit-

gehend spekuliert, ohne daß bisher eine für alle oder auch nur viele Fälle überzeugende Erklärung gefunden werden konnte. Experimente von LAZDUNSKI deuten darauf hin, daß im Falle der alkalischen Phosphatase aus E.coli zumindest ein Effekt der Half-site-Reaktivität die Kopplung der Abspaltung eines Produktmoleküls vom Enzym mit der Bindung eines neuen Substratmoleküls sein könnte (173,175).

Ebenfalls weitgehend spekulativ sind die gegenwärtigen Vorstellungen über mögliche molekulare Mechanismen, die Half-site-Reaktivität bewirken können. Nach KOSHLAND (172,174) sind folgende grundsätzlichen Möglichkeiten vorhanden:

- a) Sehr geringe Sequenzunterschiede zwischen den Untereinheiten, die bislang nicht aufgedeckt wurden, jedoch signifikante funktionelle Unterschiede bewirken;
- b) direkte sterische oder elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Bindungsstellen;
- c) unsymmetrischer Zusammenbau von chemisch identischen Untereinheiten, der auf Grund der resultierenden unterschiedlichen Raumstruktur verschiedene Reaktivität verursacht; oder
- d) ligand-induzierte negative Kooperativität zwischen Untereinheiten, die in unbeladenem Zustand in jeder Hinsicht äquivalent und ununterscheidbar sind. Derartige negative (oder Anti-) Kooperativität kann durch das von KOSHLAND entwickelte "sequentielle" Modell für ligand-induzierte konformelle Umwandlungen ("induced fit", (185)) prinzipiell beschrieben werden. Bildlich kann man sich in diesem Fall einen Half-site-Mechanismus so vorstellen, daß durch Bindung eines Substrat- oder Hemmstoff-Moleküls an ein Protomeres eine Konformationsänderung des Proteins in solcher Weise erfolgt, daß ein zweites, in unbeladenem Zustand identisches Protomeres nicht mehr mit einem weiteren Substrat- (bzw. Hemmstoff-) molekül in Wechselwirkung treten kann. Das aus $2n$ Untereinheiten aufgebaute Protein verhält sich demnach wie ein Poly-Dimeres aus n funktionellen Untereinheiten.

Wenn Fettsäuresynthetase tatsächlich aus 2×6 Polypeptidketten aufgebaut ist und wenn die vollständige Inaktivierung nach Einbau von 3 CAM-Resten pro Synthetase-Molekül nicht auf zufälliger Verunreinigung oder Modifikation des Enzyms beruht, dann gehört

die Synthetase hinsichtlich der Reaktion ihrer kondensierenden Komponente mit IAM zur Gruppe der Half-site-Enzyme. Dies gilt insbesondere auch, wenn die Grenzbeladung mit 3 CAM-Resten auf irgendeine Modifikation der peripheren SH-Gruppe oder einer anderen, am aktiven Zentrum des kondensierenden Teilenzym befindlichen Gruppe zurückzuführen ist, die nicht zufällig gerade 50% des Enzympräparates umfaßt, sondern in spezifischer und mit funktionellen Eigenschaften der Synthetase möglicherweise zusammenhängender Weise die Hälfte der Untereinheiten jedes Synthetasemoleküls betrifft.

Es sei darauf hingewiesen, daß hier nur die Reaktion des Enzyms mit dem (völlig unnatürlichen) Inhibitor IAM untersucht wurde, nicht aber die Wechselwirkung mit dem Substrat (d.h. die Bindung des Acetylrests); die Aufklärung der Stöchiometrie der Acetylbeladung wird in hohem Maße durch die Deacylase-Wirkung der Synthetase erschwert. Ferner muß durchaus nicht gefolgert werden, daß auch andere Enzymkomponenten Half-site-Reaktivität zeigen. Bemerkenswert erscheint jedoch, daß ZIEGENHORN bei der Untersuchung der Acetyl-Transferase-Komponente raschen Einbau von 3 Acetyl-Resten pro Molekül DTNB-gehemmter Synthetase beobachtete (71,135) (langsamerer weiterer Einbau von Acetylresten folgte). Auch beim Studium der Acetoacetyl-Beladung des Enzyms mit verschiedenen Methoden wurde jeweils ein Wert von ca. 3 Acetoacetylresten pro Synthetasemolekül gefunden (61, 186).

Interessant in diesem Zusammenhang sind weiterhin Resultate aus dem Arbeitskreis von VAGELOS: Studium des kondensierenden Enzyms der Fettsäuresynthese aus E.coli (der β -Ketoacyl-ACP-Synthetase) ergab, daß dieses Enzym (Molekulargewicht 66 000 Dalton (187)) aus zwei vermutlich identischen Untereinheiten aufgebaut ist (188). Nahezu vollständige (93%) Hemmung der Enzymaktivität trat jedoch ein, wenn 0,7 CAM-Reste pro Enzymmolekül gebunden worden waren (187), ein Befund, der eine 1:1-Stöchiometrie zwischen IAM und dem Enzym-Dimeren nahelegte. Auch bei der Untersuchung der Hemmung durch das Antibiotikum Caerulenin wurde festgestellt, daß vollständige und irreversible Inaktivierung nach Bindung von 1 Mol Caerulenin pro Mol Enzym-Dimeres stattfand (189). Spätere Arbeiten lassen jedoch die Möglichkeit offen, daß das bei diesen Untersuchungen verwendete Enzympräparat verunreinigt bzw. teilweise inaktiv war; eine verbesserte Anreicherungsprozedur erlaubte

die Isolierung von Hexanoyl-Enzym, das zwei Hexanoyl-Reste pro Enzymmolekül enthielt (190).

Es ist gegenwärtig nicht möglich, eine sinnvoll begründete Vermutung darüber anzustellen, auf welchem der vier oben aufgezählten möglichen molekularen Mechanismen die Half-site-Reaktivität der Synthetase gegen IAM beruhen könnte. Die bisher vorliegenden Untersuchungen zur Raumstruktur der Fettsäuresynthetase (Elektronenmikroskopie (191), Röntgen-Kleinwinkelstreuung (42), "dreidimensionale Elektronenmikroskopie" (192)) lassen keine Aussage darüber zu, ob die Untereinheiten der Synthetase in identischer Weise oder z.B. paarweise asymmetrisch in den Komplex eingebaut sind (eine solche Möglichkeit wäre im Rahmen des neuerdings von LYNEN vorgeschlagenen Modells für den räumlichen Aufbau des Synthetase-Komplexes (193) durchaus realisierbar). Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß wir eine durch Beladung der peripheren SH-Gruppen hervorgerufene Konformationsänderung - wie sie für den Fall d), die ligand-induzierte negative Kooperativität, erforderlich wäre - aus ganz anderen Gründen zu postulieren geneigt sind (vgl. Kap.6.4).

Nimmt man an, daß die beobachtete Half-site-Reaktivität der kondensierenden Enzymkomponente nicht nur für CAM-Enzym, sondern auch im Falle einer Acetyl- (bzw. Acyl-) beladung der peripheren SH-Gruppe wirksam ist und somit eine Rolle im katalytischen Mechanismus spielt, so ist es erforderlich, daß die zentralen SH-Gruppen aus zwei verschiedenen A-Ketten mit jeder der beiden am Half-site-Mechanismus beteiligten peripheren SH-Gruppen in Wechselwirkung treten kann (anderenfalls würde im gesamten Syntheseverlauf tatsächlich nur die halbe Synthesekapazität des hexameren Komplexes ausgenutzt; dies erscheint durchaus unwahrscheinlich). Es paßt zu dieser Forderung, daß SCHWEIZER, ausgehend von ganz anders gearteten genetischen Experimenten, ein Modell vorschlug, in dem ein "cross-feeding" zwischen jeweils zwei A-Ketten (wechselseitiger Transfer von Zwischenprodukten) möglich sein sollte (154,158). Enzymchemische Untersuchungen, ob und in welchem Maße gegebenenfalls Teilenzyme einer Polypeptidkette mit aktiven Zentren anderer Ketten wechselwirken können, wurden bisher nicht durchgeführt.

Bei obligatorischer Half-site-Reaktivität wäre ferner zu fordern,

daß die kondensierende Teilaktivität der Synthetase nach Dissoziation des Komplexes in Untereinheiten in jedem Fall verschwunden sein sollte. Dies ist tatsächlich der Fall: nach Ergebnissen von WEITHMANN ist die Kondensation im LiCl-gespaltenen Enzym völlig inaktiv und wird bei Reassoziierung des Komplexes von allen Teilaktivitäten am langsamsten reaktiviert (43); kinetische Untersuchungen deuten darauf hin, daß an der Reaktivierung der Kondensationsreaktion wahrscheinlich ein Assoziationsschritt beteiligt ist, daß das aktive Zentrum der kondensierenden Enzymkomponente also erst bei Zusammenlagerung zweier Polypeptidketten gebildet wird. Bei der Reaktivierung sind ferner SH-Gruppen beteiligt (43,65). Auch mit keiner anderen Spaltungsmethode gelang es bisher, kondensations-aktive Untereinheiten zu isolieren.

Wichtig ist weiterhin der Befund von HESS (194), daß nach Reaktion der Synthetase mit IAM - auch unter den schonenden Bedingungen, wie sie in Kap.2 beschrieben sind - mit Hilfe der Diskoelektrophorese eine Dissoziation des Komplexes festzustellen ist; in der analytischen Ultrazentrifuge (61) und im Sucrose-Gradienten (194 und Kap.5.2) hingegen verhält sich CAM-Synthetase wie ein Teilchen mit dem Molekulargewicht des nativen Enzyms. Da unsere Untersuchungen (vgl. Kap.3 und Kap.4) ergeben haben, daß einziger Vorgang bei der Umsetzung der Synthetase mit IAM bei 0°C die Carboxamidomethylierung peripherer SH-Gruppen ist, muß man folgern, daß diese peripheren Sulfhydrylgruppen am Zusammenhalt der Quartärstruktur des Komplexes mitwirken. Vorstellbar erscheint etwa, daß die basische Gruppe, die mit dem peripheren Thiol in Wechselwirkung steht (vgl. Kap.2.4) Bestandteil nicht derselben Polypeptidkette ist wie die periphere SH-Gruppe, sondern zu einer anderen A-Kette gehört. IAM-Beladung würde zur Aufhebung der Wechselwirkung dieser basischen Gruppe mit dem peripheren Thiol führen. Hierdurch wäre einerseits ein Mechanismus gegeben, mit dem der Einfluß des Beladungszustandes der peripheren SH-Gruppe auf die Konformation einer anderen Polypeptidkette (negative Kooperativität) erklärt werden könnte; die periphere SH-Gruppe wäre ja eine Kontaktstelle zwischen zwei A-Ketten. Andererseits ließe sich verstehen, weshalb nach CAM-Beladung der Zusammenhalt des Synthetasekomplexes so geschwächt ist, daß im elektrischen Feld (nicht aber im Schwerfeld) Aufspaltung in die Untereinheiten beobachtet wird. Beispiele für aktive Zentren von Enzymen mit

Quartärstruktur, die aus Aminosäure-Seitenketten von zwei verschiedenen Polypeptidketten räumlich aufgebaut sind, sind beschrieben (195-197). - Dieses Modell ist vorerst rein spekulativ; weitere Untersuchungen werden erforderlich sein, um es zu bestätigen oder zu widerlegen.

Auch über die Vorteile, die Half-site-Reaktivität der kondensierenden Enzymkomponente für die Fettsäuresynthetase bieten könnte, kann vorerst nur spekuliert werden. Denkbar wäre z.B. ein Zusammenhang mit der komplex-internen Koordinierung der Folge der Reaktionsschritte des Syntheseprozesses. Es ist bisher unbekannt, ob das "Weiterreichen" der Zwischenprodukte von einer Enzymkomponente zur nächsten durch den "Schwingarm" des ACP lediglich durch die unterschiedlichen Affinitäten der Teilenzyme zu den verschiedenen Acylresten kontrolliert wird, oder ob es irgendwelche die Abfolge regulierenden Mechanismen gibt. LAZDUNSKI hat - ohne über konkrete Beispiele zu verfügen - auf die prinzipiellen Vorteile hingewiesen, die Half-site-Mechanismen gerade für Multienzymkomplexe haben könnten, in denen eine Untereinheit in kontrollierter Weise nacheinander mit mehreren anderen in Wechselwirkung treten muß (173,175). Wenn sich unsere Vermutung einer Half-site-Reaktivität der kondensierenden Enzymkomponente bestätigen sollte, dann ist die Hefe-Fettsäuresynthetase der unseres Wissens erste bekannte Fall eines Multienzymkomplexes mit Half-site-Reaktivität.

5.4.2 Experimenteller Test auf Half-site-Reaktivität

Ausgehend von der Annahme, daß im Synthetasekomplex sechs Cysteinreste vorhanden sind, die sich in identischer chemischer Umgebung (Primärstruktur) befinden und von denen drei im nativen Enzym durch IAM alkylierbar sind, unternahmen wir folgenden Versuch zur experimentellen Überprüfung des Vorschlages einer Half-site-Reaktivität. Wird nach vollständiger Inaktivierung des Enzyms durch IAM der überschüssige Hemmstoff durch Gelfiltration entfernt und das Protein anschließend durch Harnstoffzusatz denaturiert, so sollten alle noch vorhandenen freien SH-Gruppen der

Synthetase (ca. 135, (44)) nunmehr etwa gleiche Reaktivität gegen IAM zeigen. Zusatz von ^{14}C -IAM ergibt demnach Peptidmaterial, das an vielen Thiolgruppen radioaktiv markiert ist, darunter auch an denjenigen SH-Gruppen, die hinsichtlich der Aminosäuresequenz in ihrer Umgebung mit den (nicht-radioaktiv alkylierten) peripheren SH-Gruppen identisch sind (vgl. das Schema in Abb.32).

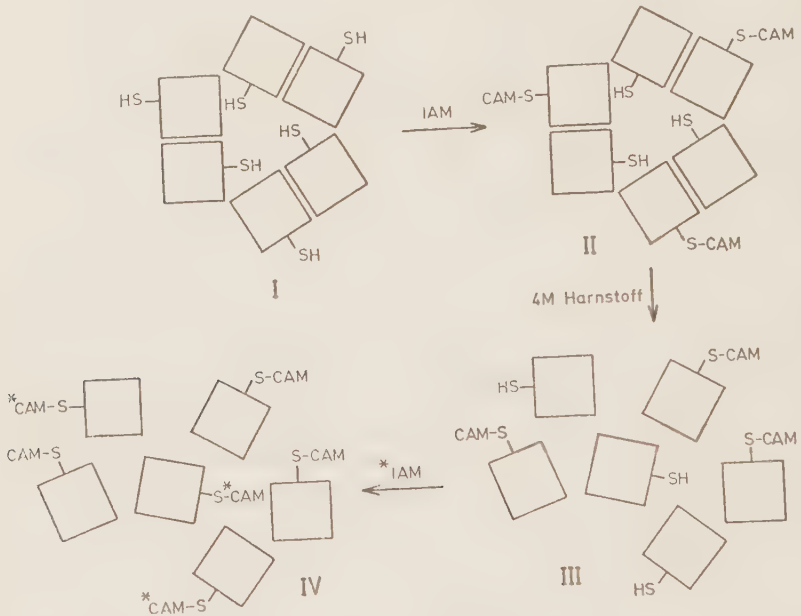


Abb.32 Schema der experimentellen Überprüfung der Half-site-Reaktivität von Fettsäuresynthetase

I. Native Synthetase wird mit IAM behandelt; II. Inaktives (CAM)₅-Enzym wird nach Entfernen des IAM mit Harnstoff denaturiert; III. Nach Denaturierung und Dissoziation sind auch vorher verborgene SH-Gruppen dem radioaktiven IAM zugänglich; IV. Im gewonnenen Polypeptidgemisch sind die (im nativen Zustand zugänglichen) peripheren SH-Gruppen nicht-radioaktiv carboxamidomethyliert, während etwa vorhandene, in nativem Zustand dem Reagens nicht zugängliche, aber in der gleichen chemischen Umgebung befindliche SH-Gruppen sowie zahlreiche andere Thiolgruppen nun radioaktive CAM-Markierung tragen. - Zur besseren Übersichtlichkeit wurden nur die peripheren SH-Gruppen und ihre nativ nicht-alkylierbaren Analoga eingezeichnet.

Nach tryptischer Spaltung und Anwendung der in Kap.4 beschriebenen Reinigungsmethoden sollte es dann möglich sein, ein radioaktiv mar-

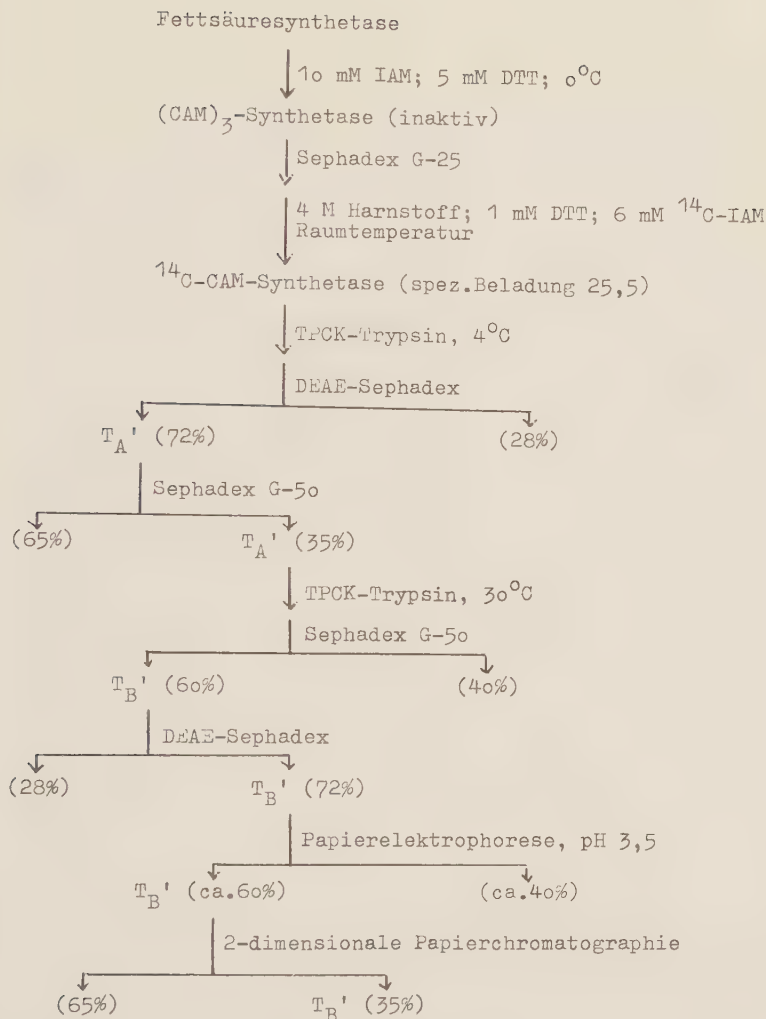


Abb. 33 Schema der Herstellung und Reinigung von T_B' (vgl. Text)

Die Prozentzahlen geben an, welcher Teil der insgesamt eluierten bzw. aufgetragenen Radioaktivität sich jeweils in den T_A'- bzw. T_B'-Fraktionen befand.

kiertes " T_B '-Peptid" zu gewinnen, das mit dem nach radioaktiver Carboxamidomethylierung nativer Synthetase erhaltenen T_B -Peptid identisch sein muß.

Bei der Durchführung des Versuchs war zu beachten, daß es nicht möglich ist, die Höhe der spezifischen Beladung des Enzyms mit nicht-radioaktiven CAM-Resten zu messen. Es mußte sichergestellt werden, daß nicht etwa periphere SH-Gruppen des zum ersten Beladungsschritt (mit "kaltem" IAM) verwendeten Enzyms teilweise oxydiert und hierdurch nicht-alkylierbar waren, nach der Behandlung mit Harnstoff (die zur Vermeidung der Oxydation von nun freigelegten SH-Gruppen in Gegenwart eines Thiols durchgeführt werden mußte) aber der Alkylierung durch radioaktives IAM unterliegen könnten. Wir führten daher die Umsetzung mit "kaltem" IAM (10 mM) in Gegenwart von 5 mM DTT aus (Restaktivität nach 60 min bei 0°C : 0,4%), entfernten IAM und DTT durch Gelfiltration und inkubierten die CAM-Synthetase sodann mit 4 M Harnstoff in Gegenwart von 1 mM DTT. Zusatz von 6 mM ^{14}C -IAM und Inkubation über Nacht bei Zimmertemperatur lieferte eine Lösung von (dissoziierter) ^{14}C -CAM-Synthetase. Ihre spezifische Beladung bestimmten wir zu 25,5 CAM-Resten pro Synthetasemolekül; nur 18,5% aller zu erwartender Cysteinreste waren demnach alkyliert worden.

Nach Verdauung des Proteins mit TPCK-Trypsin wurde das Peptidmaterial den in Kap.4 beschriebenen Reinigungsoperationen unterworfen. Nach jedem Schritt wurde jener Teil des radioaktiven Materials gesammelt, der sich ebenso verhielt wie "authentisches" T_A - bzw. T_B -Peptid; die durch radioaktive Carboxamidomethylierung nativer Synthetase hergestellten Vergleichspeptide wurden parallel den gleichen Reinigungsprozeduren unterworfen. Alles übrige (teilweise radioaktive) Peptidmaterial wurde verworfen. Abb.33 zeigt schematisch den Reinigungsgang für T_B '; die Prozentzahlen geben den Anteil der insgesamt eluierten (Säulenschritte) oder aufgetragenen (Papier) Radioaktivität an, der sich in den jeweils weitergereinigten Fraktionen befand. Bei der Papierelektrophorese wurde der Anteil von T_B ' an der Gesamtradioaktivität aus dem Flächenverhältnis der im Scanner-Diagramm sichtbaren radioaktiven Gipfel ermittelt; bei der zweidimensionalen Papierchromatographie (Abb.34) wurde wegen der geringen, noch zur Verfügung stehenden Radioaktivitätsmenge der Bogen nach Entwicklung in beiden Richtungen und Anfärben der vorhandenen Peptide mit Fluorescamin in

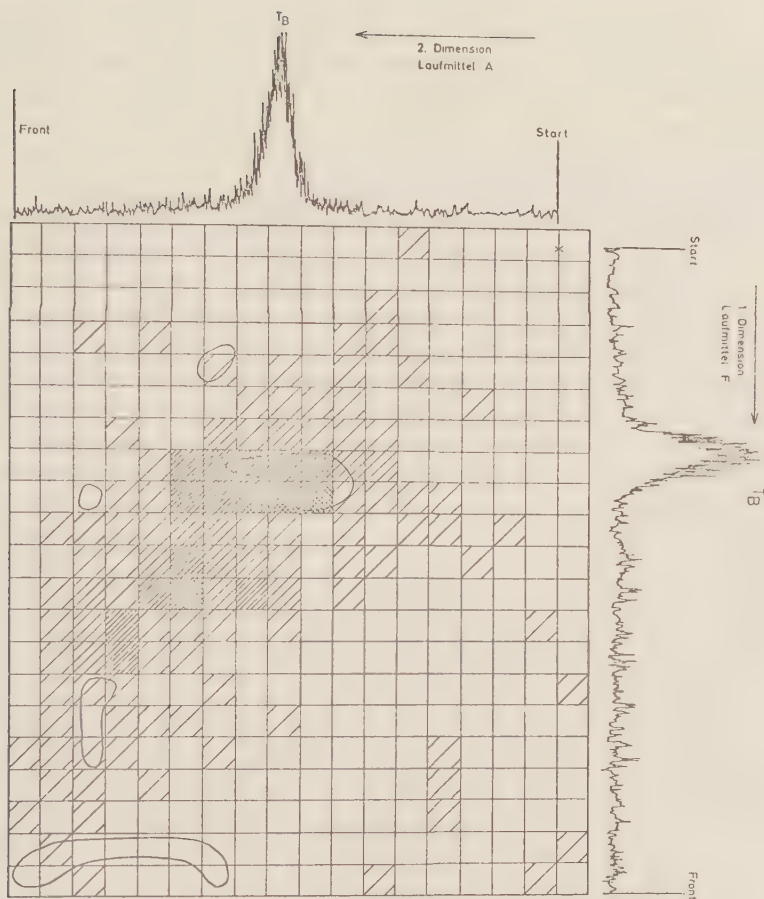


Abb.34 Zweidimensionale Papierchromatographie von T_B
 Papier: Whatman 1; Laufmittel F bzw. A. Am Rand des Bogens lief jeweils eine Probe T_B als Referenz mit; ihre Position wurde im Streifenzähler ermittelt. T_B war vorher gemäß Abb.32 durch Säulenchromatographie und Elektrophorese gereinigt worden. An den umrandeten Stellen befand sich fluorescamin-positives Peptidmaterial. Zur Bestimmung der Position der Radioaktivität wurde der Bogen in Quadrate ($1,5 \times 1,5$ cm) zerschnitten und jedes Quadrat im Szintillationszähler gezählt. Bedeutung der Schraffierung:

	weniger als 10 cpm		51 bis 70 cpm
	10 bis 30 cpm		mehr als 70 cpm
	31 bis 50 cpm		

Quadrate zerschnitten und die Radioaktivität jedes Quadrats gemessen. Zu den experimentellen Einzelheiten des Reinigungsganges vgl. Kap.7.5.2.

Es ist ersichtlich, daß nach diesen Reinigungsprozeduren das Hauptpeptid (das nach den Ergebnissen aus Kap.4 nunmehr frei von Verunreinigungen sein sollte) sich ebenso verhält wie T_B . Hierdurch ist gezeigt, daß außer den drei peripheren SH-Gruppen, die durch IAM im nativen Zustand des Enzyms alkyliert werden können, noch weitere in identischen Sequenzabschnitten befindliche Cysteinreste vorhanden sind, die durch IAM erst nach Denaturierung der Synthetase angegriffen werden. Die Möglichkeit, daß reine, voll aktive Fettsäuresynthetase über 5 bis 6 IAM-alkylierbare periphere SH-Gruppen verfügt, daß aber durch Modifizierung eines Teils dieser Gruppen einige davon im allgemeinen nicht in Reaktion treten können, scheint hierdurch ausgeschlossen oder doch sehr unwahrscheinlich.

Aus Abb.34 ist weiter ersichtlich, daß T_B' nach 4 säulenchromatographischen und einem papierelektrophoretischen Schritt noch nicht in reiner Form vorlag, sondern noch durch radioaktive und nicht-radioaktive Begleitpeptide verunreinigt war, die erst bei der Papierchromatographie abgetrennt wurden. Entsprechende Ergebnisse hatten wir auch für T_B (vgl. Kap.4.4) und für tryptische Acetyl-Peptide (vgl. Kap.4.3) gefunden. Dies zeigt, daß es zur Charakterisierung von Spaltpeptiden aus Proteinen, die ein so hohes Molekulargewicht besitzen wie die Fettsäuresynthetase, keineswegs ausreichend ist, das Verhalten der Peptide bei ein oder zwei Fraktionierungsverfahren zu untersuchen und ggf. mit Referenzpeptiden zu vergleichen. Ein sicherer Nachweis der Identität etwa der Peptide T_B und T_B' konnte erst nach dem gesamten, in Abb.33 dargestellten Reinigungsgang als gegeben angesehen werden.

Auf der Basis der in Abb.33 angegebenen Prozentzahlen kann man versuchen, das "Half-site-Experiment" quantitativ auszuwerten. Man findet, daß 2,3% der ursprünglich vorhandenen, radioaktiven CAM-Reste auf T_B' entfallen; bei einer spezifischen Anfangsbeladung von 25,5 bedeutet dies, daß 0,58 ^{14}C -CAM-Reste pro Synthetasmolekül unter den angewandten Bedingungen an die der peripheren SH-Gruppe chemisch identischen Thiolgruppen gebunden werden.

Dieser Wert ist groß genug, daß die Möglichkeit ausgeschlossen werden kann, daß bei Reaktion der Synthetase mit "kaltem" IAM aus unbekannten Gründen weniger als 3 CAM-Reste eingebaut wurden und daß das Auftreten von T_B' lediglich auf Beladung des noch nicht alkylierten Rests der drei stets zugänglichen peripheren SH-Gruppen beruht. (Die spezifische Beladung mit nicht-radioaktiven CAM-Resten ist nicht meßbar, alle Erfahrungen sprechen jedoch dafür, daß mindestens 3 CAM-Reste inkorporiert wurden; vgl. Kap.2.4).

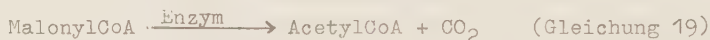
Unbewiesen, jedoch nicht unbegründet erscheint uns die Annahme, daß im harnstoff-denaturierten Enzym alle Cysteinreste mit etwa vergleichbarer Geschwindigkeit mit IAM reagieren können. Nimmt man ferner an, daß bei den säulenchromatographischen Schritten (deren Gesamtausbeuten zwischen 70% und 100% der eingesetzten Radioaktivität lagen) die Zusammensetzung der insgesamt eluierten Radioaktivität mit der Zusammensetzung der aufgetragenen Probelösung übereinstimmt (d.h. daß die verschiedenen ^{14}C -CAM-Peptide mit etwa gleicher Ausbeute eluiert werden), so läßt sich an Hand der spezifischen Beladung (18,5% der freien Cysteinreste) berechnen, daß im gesamten Synthetasemolekül $0,58:0,185 = 3,1 T_B'$ -Bindungsstellen vorhanden sind (d.h. Cysteinreste, die erst nach Denaturierung für IAM zugänglich sind und sich in gleichen Abschnitten der Primärstruktur befinden wie die periphere SH-Gruppe). Die ausgezeichnete Übereinstimmung dieses Wertes mit der Zahl der für Half-site-Reaktivität geforderten Bindungsstellen ist ermutigend; sie kann jedoch wegen der genannten Unsicherheiten keinesfalls als beweisend angesehen werden.

6

Malonyl-CoA-Decarboxylase

6.1 Nachweis der Decarboxylase

OESTERHELT fand, daß bei der Reaktion der Fettsäuresynthetase mit IAM zwar die fettsäuren-synthetisierende Aktivität verschwindet, gleichzeitig jedoch eine neue enzymatische Aktivität entsteht: IAM-gehemmtes Enzym vermag die Decarboxylierung von MalonylCoA nach Gleichung 19 zu katalysieren; Produkt ist hierbei AcetylCoA (61):



Von den vier von OESTERHELT ausgearbeiteten Methoden zu Nachweis und Bestimmung der Decarboxylase verwendeten wir die folgenden zwei Verfahren:

a) Gekoppelter optischer Test: nach dem Prinzip der AcetylCoA-Bestimmung (198) verwendet man Citratsynthase und Malatdehydro-



Abb. 35 Optischer Decarboxylase-Test mit Citratsynthase und Malatdehydrogenase

22,5 µg Enzym (30 min bei 0°C mit 2 mM IAM vorbehandelt); Ansatz vgl. Kap. 7.6.1. Zum angegebenen Zeitpunkt Start mit 0,19 mM MalonylCoA.

genase als Hilfsenzyme. Das entstehende AcetylCoA wird durch sie in Gegenwart von Malat und NAD^+ abgefangen; Meßgröße ist das pro Zeiteinheit gebildete NADH, dessen Absorption bei 334 nm gemessen wird (Abb.35). Als Maß für die Aktivität gilt der lineare Bereich der Kurve. - Diese Methode wurde im allgemeinen verwendet.

Abbildung 36 zeigt die Enzymabhängigkeit der Testmethode a); Linearität wurde bei Verwendung von bis zu 14 mE Decarboxylase (beim verwendeten Präparat ca. 0,15 mg) gefunden.

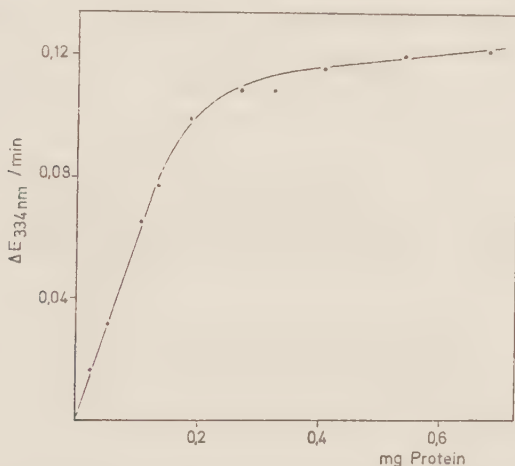


Abb.36 Enzymabhängigkeit des Decarboxylase-Tests a)

Ansatz vgl.Kap.7.6.1. Decarboxylase-Aktivität des verwendeten Enzympräparates: 95 mE/mg

Wegen der hohen Spezifität der Citratsynthase ist es mit Testmethode a) nicht möglich, Versuche zur Substratspezifität der Decarboxylase durchzuführen: das Hilfsenzym akzeptiert nur AcetylCoA, nicht aber z.B. Modellsubstrate wie N,S-Diacetylcysteamin.

b) Gekoppelter Test mit Fettsäuresynthetase als Hilfsenzym: entstehendes AcetylCoA wird von im Überschuß anwesender, nicht-carboxamidomethylierter Synthetase als Starter zur Fettsäuresynthese verwendet. Meßgröße ist (wie im Synthetase-Standardtest) der Verbrauch von NADPH, gemessen durch die zeitliche Extinktionsabnahme bei 334 nm. Zum Ansatz und zur Auswertung vgl. Kap.6.2.

6.2 Bildungskinetik der Decarboxylase

Nach unseren Ergebnissen (vgl. Kap.2 bis Kap.5) tritt IAM ausschließlich mit peripheren SH-Gruppen in Reaktion. Demzufolge muß die Fähigkeit der Synthetase, MalonylCoA mit hoher Geschwindigkeit zu decarboxylieren, durch die Carboxamidomethylierung dieser Thiolgruppen hervorgerufen werden. Es ist also zu fordern, daß die Bildungsgeschwindigkeit der Decarboxylase mit der Geschwindigkeit der Synthetase-Inhibierung übereinstimmt.

Tatsächlich gab OESTERHELT für das Auftreten der Decarboxylase-Aktivität eine bimolekulare Geschwindigkeitskonstante $k_2 = 1,4 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ an, übereinstimmend mit dem für die IAM-Hemmung gefundenen Wert (61). Die Konstante wurde erhalten, indem Aliquote aus der synthetase- und IAM-haltigen Inkubationsmischung nach bestimmten Zeiten entnommen, mit überschüssigem Mercaptan "abgestoppt" (vgl. aber Kap.2.3.2!) und im gekoppelten optischen Test (Methode a) auf ihre Decarboxylaseaktivität geprüft wurden.

Selbstverständlich ist die gleiche Geschwindigkeitskonstante zu erwarten, wenn die Decarboxylierung des MalonylCoA nach einer anderen Methode gemessen wird. Versetzt man etwa eine Lösung von Fettsäuresynthetase mit IAM und mißt nach bestimmten Zeiten mit Proben dieser Mischung die fettsäuren-synthetisierende Aktivität im Synthetase-Standardtest in Abwesenheit von AcetylCoA, so ist qualitativ zunächst ein Ansteigen des zeitlichen NADPH-Verbrauchs zu erwarten: aus Synthetase wird MalonylCoA-Decarboxylase gebildet, die für die noch im Überschuß vorliegende aktive Synthetase den Starter AcetylCoA liefert; dieser wird sodann mit MalonylCoA unter NADPH-Verbrauch in Fettsäuren umgewandelt. Nach Durchlaufen eines Aktivitätsmaximums sollte sodann der zeitliche NADPH-Verbrauch wieder abfallen, wenn durch weitere Carboxamidomethylierung nicht mehr die Decarboxylase, sondern die noch vorhandene Menge Synthetase geschwindigkeitsbestimmend wird. Daß das Ergebnis des Versuchs qualitativ den Erwartungen entspricht, zeigt Abb.37; sie bestätigt den von OESTERHELT angegebenen Kurvenverlauf (61).

OESTERHELT versuchte nun, aus der Kurve entspr. Abb.37 die Geschwindigkeitskonstanten für Decarboxylase-Aktivierung und Synthetase-Hemmung zu errechnen. Der abfallende Ast lieferte nach

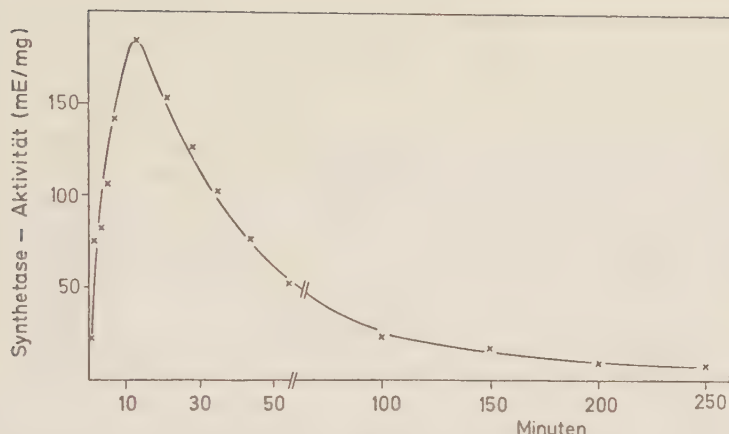


Abb. 37 IAM-induzierte Fettsäuresynthese ohne AcetylCoA

Synthetase (1,6 mg/ml) wurde bei 0°C in $0,1 \text{ M K-PO}_4$, pH 6,5, mit $0,1 \text{ mM IAM}$ inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben ($32 - 80 \mu\text{g Protein}$) entnommen und im Synthetase-Standardtest A ohne AcetylCoA gemessen. Aktivität des ungehemmten Enzyms mit AcetylCoA: 844 mE/mg .

Gleichung 3 (Kap. 2.1) den gleichen Wert für die Geschwindigkeitskonstante der Hemmung, der im Test mit AcetylCoA erhalten wurde ($1,3 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$, vgl. Kap. 2.1). Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten für den aufsteigenden Ast der Kurve ist jedoch nicht ohne weiteres nach Gleichung 3 möglich, da keine "Restaktivität", sondern eine Aktivitätszunahme gemessen wird. Folgender Ansatz erlaubt eine quantitative Auswertung des ersten Teils der Kurve:

Es ist

$$\frac{d [\text{Dec}]}{dt} = k [\text{FSS}]_t [\text{IAM}] \quad (\text{Gleichung 20})$$

Die Konzentration des in großem Überschuß vorliegenden IAM kann hierbei als konstant angesehen werden; für die zur Zeit t noch vorhandene Synthetase-Konzentration gilt

$$[\text{FSS}]_t = [\text{FSS}]_0 - [\text{Dec}] \quad (\text{Gleichung 21})$$

Somit

$$\frac{d [\text{Dec}]}{([\text{FSS}]_0 - [\text{Dec}])} = k [\text{IAM}] dt \quad (\text{Gleichung 22})$$

Integriert:

$$\frac{1}{[IAM]} \ln ([FSS]_0 - [Dec]) = kt \quad (\text{Gleichung 23})$$

Nun ist aber $[Dec]/[FSS]_0$ derjenige Teil des Gesamtproteins, der als aktive Decarboxylase vorliegt; man kann also einsetzen

$$100 \frac{[Dec]}{[FSS]_0} = x = \% \text{ Aktivierung} \quad (\text{Gleichung 24})$$

und erhält

$$\frac{1}{[IAM]} \ln \left(1 - \frac{x}{100} \right) = kt \quad (\text{Gleichung 25})$$

Es ist ersichtlich, daß zur Berechnung von k gemessen werden muß, zu welchem Prozentsatz die Decarboxylase zu bestimmten Zeiten aktiviert ist. Unmittelbare Meßgröße in obigem Versuch ist jedoch der (im aufsteigenden Ast der Kurve linear mit der Decarboxylase-Aktivität korrelierte) NADPH-Verbrauch; um prozentuale Angaben machen zu können, muß bekannt sein, welche Aktivität die Decarboxylase in "100% aktiven" Zustand besitzt.

Ausgehend von seiner Hypothese einer "decarboxylase-aktivierenden" schnellen Reaktion des IAM mit Synthetase, der dann erst die "langsame", synthetase-hemmende Alkylierung der peripheren SH-Gruppen folgen sollte, nahm OLSERHEIT an, daß die Decarboxylase-Aktivität etwa im Scheitelpunkt der Kurve von Abb.37 ihren maximalen Wert besitze. Unter dieser Annahme berechnet man aus Abb.37 in Übereinstimmung mit dem von OLSERHEIT angegebenen Wert (61) eine Geschwindigkeitskonstante $k = 26,7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$; sie stimmt mit dem für die Synthetase-Inaktivierung gefundenen Wert offensichtlich nicht überein, sondern ist ca. zwanzigmal größer.

Beachtet werden muß jedoch bei Auswertung des Versuchs, daß in Gleichung 24 der Quotient der Konzentrationen von Decarboxylase und Synthetase eingesetzt wurde; Meßgröße sind jedoch Enzymaktivitäten. Die Synthetase-Aktivität wird in der Testauswertung auf den MalonylCoA-Verbrauch bezogen (der mit dem NADPH-Verbrauch linear korreliert ist); für die Decarboxylase-Aktivität ist die AcetylCoA-Bildung maßgeblich, die mit dem MalonylCoA-Verbrauch

der Decarboxylase identisch ist. Im verwendeten Testsystem gibt jedoch jedes entstandene AcetylCoA-Molekül zur Bildung von Palmitoyl- bzw. StearoylCoA Anlaß. Untersuchungen von JUMPER (56,65) ergaben, daß bei limitierender AcetylCoA-Konzentration (unter der Bedingung also, die während der aufsteigenden Phase der Kurve aus Abb.37 herrscht) ca. 75% Stearoyl- und 25% PalmitoylCoA gebildet werden; hieraus berechnet sich ein Verbrauch von 7,7 Mol MalonylCoA pro Mol AcetylCoA. Die erhaltene Geschwindigkeitskonstante muß aus diesem Grunde noch durch 7,7 dividiert werden. Der erhaltene Wert beträgt $k = 3,5 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ und ist immer noch signifikant von der Konstante der Inhibierung verschieden.

Aus Gleichung 25 ist jedoch ersichtlich, daß man andere Werte für k berechnet, wenn man von der Annahme ausgeht, daß die Decarboxylase zum Zeitpunkt des Kurvenmaximums noch nicht zu 100% aktiviert ist. Tatsächlich ist dies durch die in Kap.2 bis Kap.5 bewiesene Nichtexistenz einer von der peripheren SH-Gruppe verschiedenen IAM-sensitiven "Aktivatorstelle" sogar ausgeschlossen: das Enzym zeigt im Kurvenmaximum ja noch Fettsäuresynthetase-Aktivität, die Alkylierung der peripheren Sulfhydrylgruppen durch IAM ist also mit Sicherheit noch nicht vollständig.

Es ist nicht möglich, aus dem in Abb.37 dargestellten Versuch zu entnehmen, in welchem Ausmaß die MalonylCoA-Decarboxylase zum Zeitpunkt des Kurvenmaximums aktiviert ist. Wir führten daher folgenden Versuch durch, der uns Aufschluß über die Kinetik der Decarboxylase-Bildung gab:

Fettsäuresynthetase wurde im Eisbad mit 0,5 mM IAM inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wurden Aliquote je einem der folgenden Tests unterzogen (Abb.38):

I) Messung der Fettsäuresynthetase-Aktivität (Standardtest A mit AcetylCoA und MalonylCoA, Kurve I). Um Konsistenz der Aktivitätswerte zwischen den Kurven zu erhalten, wurde die Synthetase-Aktivität hier ausnahmsweise nicht auf den Verbrauch von MalonylCoA, sondern von AcetylCoA bezogen; hierzu wurden die wie üblich berechneten Aktivitätswerte durch 7,5 dividiert (unter den Testbedingungen werden je ca. 50% Palmitoyl- und StearoylCoA gebildet (56,65)).

II) Messung der Fettsäuresynthetase-Aktivität ohne AcetylCoA (Standardtest mit MalonylCoA, entsprechend Abb.37; Kurve II). Die Aktivitätswerte wurden wie oben durch 7,7 dividiert.

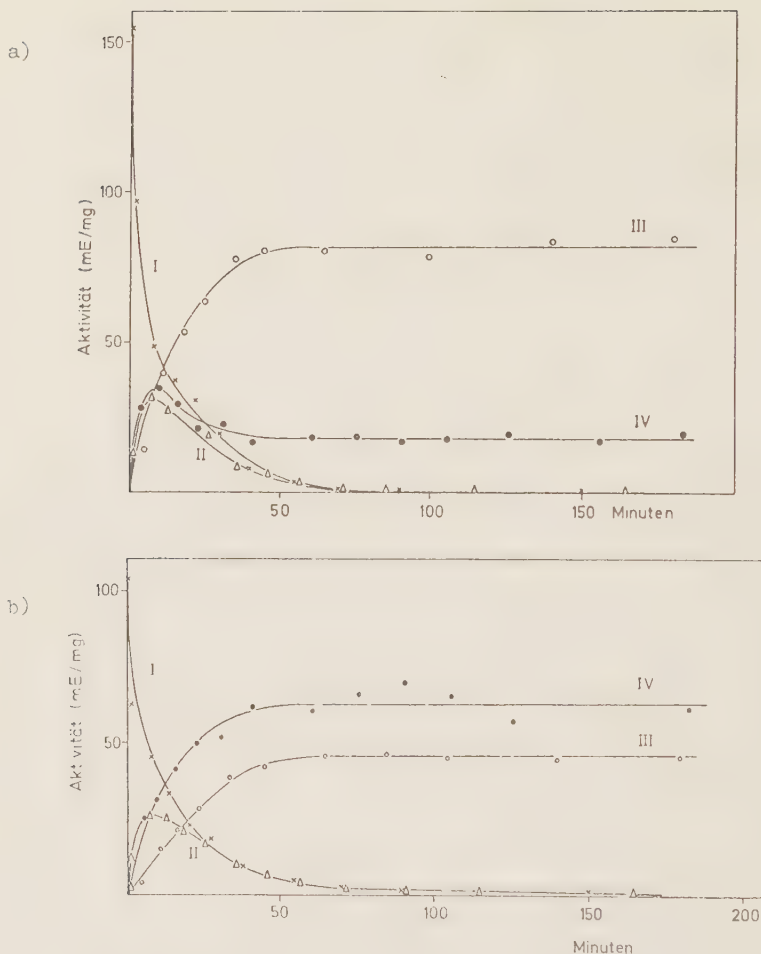


Abb. 39 Kinetik von Synthetase-Inaktivierung und Decarboxylase-bildung durch Reaktion von Synthetase mit IAM

Kurve I (x-x-x) Synthetase-Aktivität (Standardtest A); Kurve II (Δ - Δ - Δ) Synthetase-Aktivität ohne AcetylCoA (Standardtest A ohne AcetylCoA); Kurve III (●-●-●) MalonylCoA-Decarboxylase-Aktivität (Testmethode a); Kurve IV (o-o-o) MalonylCoA-Decarboxylaseaktivität (Testmethode b).

Inkubationsansatz: a) 1,25 mg/ml Synthetase, 0,5 mM IAM, 0,1 M K-PO₄, pH 6,5, 0°C; in Kurve IV je 62,5 μ g (72 mE) Synthetase als Hilfsenzym; - b) 1,4 mg/ml Synthetase, sonst wie a); Hilfsenzym-menge in Kurve IV: je 890 μ g (692 mE) Synthetase.

III) Messung der MalonylCoA-Decarboxylase-Aktivität im gekoppelten optischen Test (Methode a; Kurve III).

IV) Messung der MalonylCoA-Decarboxylase-Aktivität mit aktiver Fettsäuresynthetase als Hilfsenzym (Methode b; Kurve IV). Zugabe von 72 mE/ml Synthetase ($62,5 \mu\text{g/ml}$) führte nicht zum erforderlichen quantitativen Abfang des gebildeten AcetylCoA: das nach vollständiger Reaktion erreichte Aktivitätsplateau lag - wie der Vergleich mit Kurve III zeigte - bei zu niedrigen Aktivitätswerten. Erst Zusatz von 692 mE/ml ($890 \mu\text{g/ml}$) Fettsäuresynthetase zur Testmischung erlaubte es, die Decarboxylase-Aktivierung in ihrem vollständigen Verlauf zu messen. Wegen der großen Menge des Hilfsenzyms erhielten wir einen starken Blindlauf; Auswertung der Messungen war daher nur mit Hilfe eines schnell laufenden Schreibers (12 cm/min) in den ersten ein bis zwei Minuten des Tests möglich. Ferner führten geringe Pipettierfehler zu deutlichen Abweichungen der Meßwerte, so daß die Fehlergrenze der Werte aus Kurve IV größer ist als bei den anderen Messungen.

Die Experimente aus Abb.38 liefern folgende Ergebnisse:

1. Die in den Kurven I und IV gemessenen Vorgänge laufen synchron ab; im Rahmen der Fehlergrenze berechnet man gleiche Geschwindigkeitskonstanten für Synthetase-Inaktivierung und Decarboxylase-Aktivierung. Die Gleichzeitigkeit der beiden Vorgänge wird besonders deutlich, wenn die Meßwerte aus Abb.38b als Prozente der jeweils maximalen Aktivität aufgetragen werden (Abb.39).

2. Im Kurvenmaximum von II sind ca. 40% der maximalen Decarboxylase-Aktivität vorhanden. Auswertung des aufsteigenden Astes der Abb.37 nach Formel (25) unter Verwendung dieses Wertes liefert $k = 1,1 \pm 0,3 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$, übereinstimmend mit der Geschwindigkeitskonstante der Alkylierung der peripheren SH-Gruppen durch IAM. Da zur Vermeidung von Abweichungen alle vier Testreihen der Abb.38 a bzw. b simultan unter Verwendung der gleichen Inkubationsmischung durchgeführt wurden, war es uns nicht möglich, in der Anfangsphase der Reaktion mehr Messungen zu Kurve II vorzunehmen; es ist daher nicht sinnvoll, den aufsteigenden Kurvenast der Kurve II, Abb.38, quantitativ auszuwerten. Ersichtlich ist jedoch, daß Kurve II in ihrem ersten Teil (im Rahmen der Fehlergrenze) mit Kurve IV, in ihrem letzten Teil mit Kurve I zusammenfällt. - Prinzipiell ist

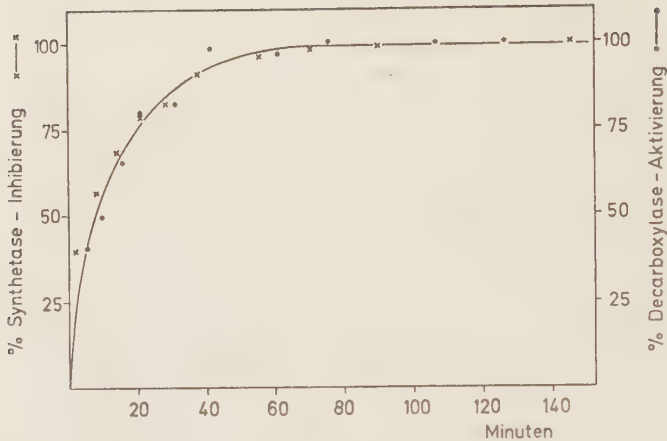


Abb.39 Gleichzeitigkeit von Synthetase-Inhibition und Decarboxylase-Aktivierung durch IAM

Prozentuale Auftragung der Meßwerte aus Abb.38b, Kurve I (Synthetase-Inhibition, x-x-x) und Kurve IV (Decarboxylase-Aktivierung, ●-●-●).

es denkbar, daß der Decarboxylase-Aktivierungsgrad im Kurvenmaximum des Versuchs von Abb.37 bzw. Abb.38, Kurve II, bei verschiedenen Enzympräparaten unterschiedlich ist; er hängt vom relativen Ausmaß der Synthetase- und Decarboxylase-Aktivität ab.

3. Die MalonylCoA-Decarboxylase-Aktivität (Kurven III bzw. IV) erreicht ihren Maximalwert - unabhängig von der Testmethode - etwa zu dem Zeitpunkt, wenn die Synthetaseaktivität auf Null gesunken ist; nach Kap.2.4 und 2.5 ist dies nach Einbau von etwa 3 CAM-Resten pro Synthetasemolekül der Fall.

4. Der mit Methode a (Kurve III) gemessene Maximalwert der Decarboxylase-Aktivität liegt etwa 30% niedriger als der mit Methode b (Kurve IV) gefundene Wert. Wir führen dies auf Reoxydation des entstandenen NADH - das ja beim Test a die Meßgröße darstellt! - durch Fettsäuresynthetase zurück (vgl. (33)); in Übereinstimmung damit konnte OESTERHELT auch nur 70% des eingesetzten MalonylCoA durch gebildetes NADH nachweisen (61).

5. Darüber hinaus liegt auch die aus der Anfangssteigung von Kurve III berechnete Geschwindigkeitskonstante um ca. 20% niedriger als

die aus Kurve IV erhaltene; bei einer prozentualen Auftragung gemäß Abb.39 würde die Kurve der Meßwerte aus III unterhalb der für I und IV berechneten Kurve verlaufen, das 100%-Plateau jedoch etwa zum gleichen Zeitpunkt erreichen. Ursache für diese scheinbar langsamere Bildung der Decarboxylase müssen Vorgänge sein, die zum Abfang des gebildeten AcetylCoA (das ja von den Hilfsenzymen abgefangen werden soll) oder des entstandenen NADH (das ja die Meßgröße ist) führen und die im Verlauf der Reaktion verschwinden, da der konstante Maximalwert der Decarboxylase-Aktivität ja zum gleichen Zeitpunkt erreicht wird wie in IV. Wir vermuten, daß die - in zunehmend geringerer Menge vorhandene - nicht-alkylierte Fettsäuresynthetase das AcetylCoA durch Acetoacetat- (61) und Triacetsäurelacton-Bildung (72,73) abfängt und zudem zum Abfang von AcetylCoA und NADH durch Fettsäuresynthese führt (43,65 und Kap.7.1.5).

Die Ergebnisse zeigen, daß die Bildung der MalonylCoA-Decarboxylase gleichzeitig mit der Hemmung der Fettsäuresynthetase abläuft. Die neue enzymatische Aktivität wird demnach durch die Carboxamido-methylierung peripherer SH-Gruppen hervorgerufen.

6.3 Einige Eigenschaften der MalonylCoA-Decarboxylase

Im folgenden wird als "Decarboxylase" IAM-behandelte Fettsäuresynthetase bezeichnet, deren Synthetase-Restaktivität weniger als 2% beträgt.

6.3.1 Stabilität

OESTERHELT berichtete (61), daß die MalonylCoA-Decarboxylase recht instabil sei: nach Abstoppen der Umsetzung der Fettsäuresynthetase mit IAM durch einen Thiol-Überschuß sinkt die Decarboxylase-Aktivität rasch ab (in unserem Experiment innerhalb von 80 min auf ca. 30%; vgl. Abb.40).

Gewarnt durch unsere zwiespältigen Erfahrungen mit "Stopplösungen" befreiten wir das Enzym vom überschüssigen IAM durch Gelfiltration an Sephadex G-25; solche SH-freie Decarboxylase war nach 6 Stun-

den noch zu 82% aktiv (die zum Test a verwendeten Hilfsenzyme Citratsynthase und Malatdehydrogenase verloren ihre Aktivität in verdünnter Lösung rascher als die Decarboxylase!). Nach der Gelfiltration zugesetztes Cystein, 2-Mercaptoäthanol oder SMCN hatten keinen Einfluß auf die Decarboxylase-Aktivität.

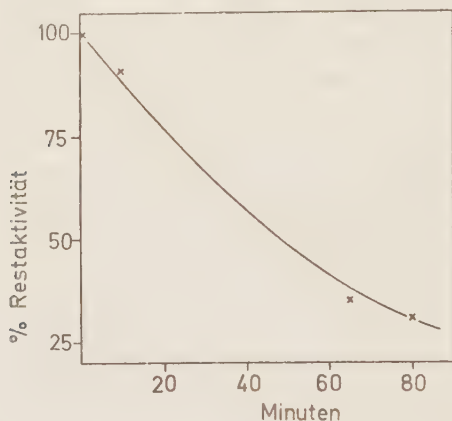


Abb. 40 Zeit-Inaktivierung der Decarboxylase

Synthetase (2,25mg/ml in 0,1 M $K-PO_4$, pH 6,5) wurde bei 0°C für 30 min mit 2 mM IAM inkubiert; dann wurde 2-Mercaptoäthanol zugesetzt (48 mM) und die Decarboxylase-Aktivität (Testmethode a) zu den angegebenen Zeiten gemessen.

6.3.2 Hemmverhalten

Ursache der von OESTERHELT gefundenen Instabilität der Decarboxylase kann zweierlei sein:

- Weitere Reaktion von nicht vollständig abgefangenem IAM mit dem Enzym. Alkylierung weiterer Gruppen des Proteins wäre möglich, wenn die Decarboxylase nach dem "Abstoppen" nicht bei 0°C aufbewahrt wird. Wir fanden, daß MalonylCoA-Decarboxylase nach Behandlung mit 5 mM IAM bei 37°C für 100 min keine meßbare Aktivität mehr zeigt.
- Beim "Abstoppen" wird durch die Umsetzung des überschüssigen IAM mit Cystein bzw. 2-Mercaptoäthanol Jodid freigesetzt; dieses

katalysiert beim Stehen an der Luft (durch intermediäre Bildung von Jod) die Oxydation von SH-Gruppen des Enzyms. Wir fanden, daß die Decarboxylase nach Behandlung mit 1 mM Jod bei 0°C für 20 min vollständig inaktiviert ist. Auch IAM selbst ist imstande, die Photooxydation von SH-Gruppen zu katalysieren (199).

Übereinstimmend mit OESTERHELT fanden wir ferner, daß die Decarboxylase durch NEM hemmbar ist: nach 30 min Inkubation bei 0°C mit 10 mM NEM war keinerlei Decarboxylase-Aktivität mehr meßbar. Dieses Ergebnis läßt sich so interpretieren, daß der Malonylrest in Thioesterbindung an die zentrale SH-Gruppe der Decarboxylierung unterliegt; NEM unterbindet die Malonyl-Beladung des ACP (Kap.2.6.3 und (61)).

6.3.3 Substratspezifität

Mit Hilfe der Testmethode b ließ sich zeigen, daß auch die Modellsubstrate S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin und S-Malonyl-N-acetyl-cysteamin von IAM-behandelter Synthetase decarboxyliert werden; auch die Decarboxylierung dieser Verbindungen wird durch NEM völlig unterbunden (1 mM NEM, 20 min bei 0°C und pH 6,5). Da die Modellsubstrate den Malonylrest auf das Enzym übertragen können, ist dieses Ergebnis nicht überraschend.

6.3.4 Start der Fettsäuresynthese mit IAM

Die Bildung der MalonylCoA-Decarboxylase durch Reaktion der Fettsäuresynthetase mit IAM kann auch im Testansatz des Standardtests beobachtet werden. Während der NADPH-Verbrauch bei Vorinkubation des Enzyms mit AcetylCoA und Start durch Zugabe von MalonylCoA von Anfang an zeitlich linear und mit maximaler Geschwindigkeit erfolgt, beobachtet man bei Vorinkubation der Synthetase mit MalonylCoA (in Abwesenheit von AcetylCoA) nach Zugabe von 0,5 mM IAM einen im Zuge einer Anlaufphase zunehmenden NADPH-Verbrauch;

die im ersten Fall gemessene Maximalgeschwindigkeit wird nicht erreicht (Abb.41).

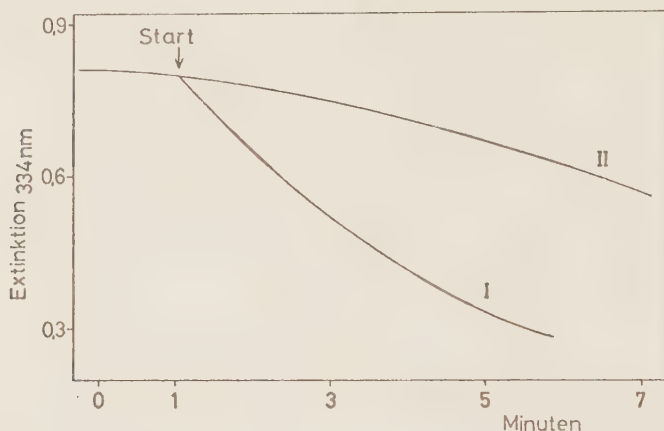


Abb.41 Start der Fettsäuresynthese mit IAM

Kurve I: Standardtest A (Start mit MalonylCoA); Kurve II: Vorinkubation im Testansatz ohne AcetylCoA mit 0,12 mM MalonylCoA, Start mit 0,5 mM IAM

OSTERMEIER führte die Gestalt der Kurve II, die der beim Start mit AcetylCoA erhaltenen gleicht, auf die "Lösung einer Bremse der Fettsäuresynthese" (durch Alkylierung der vermuteten, decarboxylase-aktivierenden IAM-Bindungsstelle) zurück (61). Nach unseren Ergebnissen ist der Kurvenverlauf so zu verstehen, daß nach Zugabe von IAM durch Carboxamidomethylierung der peripheren SH-Gruppen allmählich ($k = 1,3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) die MalonylCoA-Decarboxylase gebildet wird; die Fettsäuresynthese durch die - für die Dauer des Tests im Überschuß vorliegende - nichtgehemmte Synthetase wird daher nach und nach durch zunehmende Anlieferung des Starters AcetylCoA beschleunigt.

Bemerkenswert bleibt die Tatsache, daß es möglich ist, die Bildung von Fettsäuren aus MalonylCoA durch Zugabe eines Hemmstoffs der Fettsäuresynthetase zu starten.

6.4 Diskussion: Zum Mechanismus der Decarboxylierung von MalonylCoA

Die Abspaltung von CO_2 aus dem an die zentrale SH-Gruppe gebundenen Malonylrest ist Bestandteil der normalen, zur Bildung von Fettsäuren führenden Reaktionsfolge der ungehemmten Fettsäuresynthetase. Sie vollzieht sich hierbei gleichzeitig (58,59) mit der Knüpfung der neuen Bindung zwischen dem Methylen-Kohlenstoffatom des Malonylrests und der Carbonylgruppe des von der peripheren SH-Gruppe übertragenen Acetyl- (bzw. Acyl-) rests.

In Abwesenheit von AcetylCoA zeigt ungehemmte Synthetase eine gewisse MalonylCoA-Decarboxylase-Aktivität (61,68); diese beträgt jedoch nur 1-2% der Fettsäuresynthetase-Aktivität. Entstehung von freiem AcetylCoA findet hierbei nicht statt; vielmehr wird nach (61) der an die zentrale SH-Gruppe gebundene Malonylrest decarboxyliert, der entstandene Acetylrest auf die (freie) periphere SH-Gruppe transferiert und mit einem weiteren Malonylrest zu Acetoacetyl-Enzym kondensiert. In Gegenwart von NADPH kann nun weiterer Umsatz zu Fettsäuren stattfinden (die Geschwindigkeit der Fettsäuresynthese durch native Synthetase ohne AcetylCoA, also aus MalonylCoA allein, in Gegenwart von NADPH liegt in der Größenordnung von 1-2% der Aktivität mit AcetylCoA und MalonylCoA). In Abwesenheit von reduziertem Pyridinnucleotid hingegen findet nur in dem Maß weitere Decarboxylierung statt, in dem der Acetoacetylrest freigesetzt (Bildung von Acetoacetat (61)) oder auf die periphere SH-Gruppe übertragen wird (durch weitere Kondensation erfolgt dann Bildung von Triacetsäurelacton (72,73)).

Nach Literaturangaben sind auch Fettsäuresynthetasen aus anderen Quellen in ähnlicher Weise zur Decarboxylierung von MalonylCoA befähigt (48,49,201,202); die Decarboxylaseaktivität beträgt in diesen Fällen ca. 4-6% der Synthetaseaktivität und wurde manchmal auf Verunreinigung der Synthetase zurückgeführt (203). Lediglich im Falle des Taubenleber-Enzyms wurde neuerdings berichtet, daß mit MalonylCoA allein (ohne AcetylCoA) Fettsäuresynthese mit 25-30% der Aktivität mit MalonylCoA und AcetylCoA stattfinden soll (204). Malonyl-ACP (nicht aber MalonylCoA) wird auch durch die β -Ketoacyl-ACP-synthetase aus *E.coli* decarboxyliert (205,206).

Bislang einzigartig an der Hefe-Fettsäuresynthetase ist, daß ihre MalonylCoA-Decarboxylase-Aktivität durch Behandlung des Enzyms mit IAM gewaltig gesteigert werden kann. Die zunächst naheliegende Erklärung hierfür ist folgendes Bild (12,61,207): in der carboxamidomethylierten Synthetase kann der durch CO_2 -Abspaltung aus dem ACP-gebundenen Malonylrest entstandene Acetylrest nicht mehr auf die periphere SH-Gruppe übertragen werden; er wird vielmehr (über die Acetyl-Transferase-Komponente des Enzymkomplexes) auf Coenzym A rückübertragen. Die Decarboxylierung stellt die Analogie zur Kondensation unter Aufnahme eines Protons anstelle eines Acylrests dar.

OESTERHELT erkannte (61), daß diese einfache Deutung nicht in der Lage ist zu erklären, weshalb die Fettsäuresynthese durch ungehemmtes Enzym aus MalonylCoA allein (ohne AcetylCoA) in Gegenwart von NADPH viel langsamer abläuft als die MalonylCoA-Decarboxylierung durch CAM-Synthetase: wie Abb.38b zeigt, erzeugt die Decarboxylase AcetylCoA mit bis zu 60% der Geschwindigkeit, mit der es von ungehemmter Synthetase maximal verbraucht werden kann; etwa gleich groß sollte nach obiger Hypothese die Fettsäuresynthese-Geschwindigkeit aus MalonylCoA allein sein, wie erwähnt beträgt sie jedoch nur 1-2% der Synthetase-Aktivität mit MalonylCoA und AcetylCoA. Fettsäuresynthetase ist demnach erst dann imstande, ACP-gebundene Malonylreste zu decarboxylieren, wenn AcetylCoA (im Verlauf der normalen Synthese) oder IAM anwesend sind. OESTERHELT versuchte, das Problem durch das (auch durch andere Versuche scheinbar nahegelegte)Postulat einer für AcetylCoA und IAM zugänglichen "decarboxylase-aktivierenden Regulatorstelle" an der Synthetase zu lösen.

Unsere Ergebnisse haben die Nichtexistenz einer von der peripheren SH-Gruppe verschiedenen IAM-Bindungsstelle bewiesen: weder wird IAM in signifikanten Maße an der Synthetase nichtkovalent assoziiert (Kap.2.5), noch werden CAM-Reste an andere Gruppen gebunden als an Cysteinreste (Kap.3), noch handelt es sich um andere Cysteinreste als um solche, die mit der Acetyl-Bindungsstelle der kondensierenden Enzymkomponente - also der peripheren SH-Gruppe - identisch sind (Kap.4), noch bieten die kinetischen Experimente einen Anlaß zur Annahme verschiedener Bindungsstellen (Kap.2 und Kap.6.2). Man kann dieses Resultat so formulieren, daß die von OESTERHELT geforderte "Aktivatorstelle" mit der peripheren SH-Gruppe identisch sein muß.

Tatsächlich ist die Fähigkeit der Synthetase, Malonylreste mit hoher Geschwindigkeit zu decarboxylieren, immer dann vorhanden, wenn die periphere SH-Gruppe besetzt ist, sei es durch einen Acetyl- oder Acylrest im Zuge der normalen Fettsäuresynthese oder durch einen CAM-Rest nach Reaktion mit IAM. Keine Rolle spielt dabei, ob gleichzeitig mit der CO_2 -Abspaltung Kondensation stattfinden kann: auch wenn entweder der an der peripheren SH-Gruppe befindliche Rest (z.B. die Carboxamidomethylgruppe in Thioätherbindung) oder der an die zentrale SH-Gruppe gebundene (z.B. der Methylmalonylrest, (61)) nicht zur Kondensation befähigt ist, so stimuliert die Beladung der peripheren SH-Gruppe dennoch die Decarboxylierung des Malonyl- (bzw. Methylmalonyl-) rests. Mit anderen Worten: der auf die periphere SH-Gruppe Übertragene Rest induziert die Ausbildung der aktiven Konformation für die nachfolgende Decarboxylierung des ACP-gebundenen Malonyl-rests, also die Entstehung eines aktiven Zentrums für die Kondensationsreaktion. Der Effekt des Acetylrests kann durch den CAM-Rest simuliert werden.

Wie kann man nun verstehen, daß die Bindung zwischen Methylen- und Carboxyl-Kohlenstoff des Malonylrests offenbar "labilisiert" wird, wenn die periphere SH-Gruppe besetzt ist? Wie mehrfach erwähnt, legten kinetische Untersuchungen die Annahme nahe, daß die periphere SH-Gruppe in freiem Zustand mit einer basischen Gruppe des Proteins über eine Wasserstoffbrücke in Wechselwirkung steht (vgl. Kap.2.4); diese kann nach Carboxamidomethylierung in protoniertem Zustand zurückbleiben (möglicherweise ist dies auch nach Acylierung des peripheren Thiols der Fall). Ihre Wechselwirkung mit der SH-Gruppe ist aufgehoben. Plausibel erscheint die Vorstellung, daß die nun im aktiven Zentrum des kondensierenden Teilenzym vorhandene protonierte basische Gruppe mit der Carboxylgruppe des Malonylrests in solcher Weise in elektrostatische Wechselwirkung treten kann, daß dieser in eine reaktionsbereite ("gespannte") Konformation gebracht wird und leicht CO_2 verliert. Die nach Beladung der peripheren SH-Gruppe freiwerdende protonierte Gruppe ist demnach wesentlicher Bestandteil der Malonyl-Bindungsstelle am kondensierenden Teilenzym, an der der Malonylrest nichtkovalent fixiert wird.

Eine weitergehende Hypothese zum Mechanismus der IAM-induzierten Malonyl-Decarboxylierung stellt die Annahme einer substrat- bzw. hemmstoff-induzierten Konformationsänderung der kondensierenden Enzymkomponente dar; diese Möglichkeit ist schematisch in Abb.42 dargestellt. Es wurde hierbei wieder willkürlich angenommen, daß die ursprünglich mit dem peripheren Thiol wechselwirkende, nach Acyl- oder CAM-Beladung in protoniertem Zustand verbleibende basische Gruppe bei der Fixierung des Malonylrests mitwirkt; ebenso gut wäre denkbar, daß im Zuge der Konformationsänderung eine andere positive Gruppe in die zur Malonyl-Bindung geeignete räumliche Lage gebracht wird.

In unbeladenem Zustand würde nach diesem Schema die kondensierende Enzymkomponente in einem Konformationszustand I vorliegen (a), in dem die partiell positiv geladene basische Gruppe B im Inneren des Proteins verborgen ist und nicht mit dem Malonylrest in Wechselwirkung treten kann. Dieser (und Reagentien wie Jodessigsäure) würden vielmehr durch die negative Partialladung am peripheren Schwefel abgestoßen. Acylierung oder Carboxamidomethylierung der peripheren SH-Gruppe würde zu einer konformellen Umwandlung in einen Zustand II führen (b); in diesem befindet sich die protonierte BH-Gruppe in günstiger räumlicher Anordnung zur Malonyl-Fixierung und "Labilisierung" der Carboxylat-Gruppe (c); im Zuge der Fettsäuresynthese kann nunmehr Kondensation unter CO_2 -Abspaltung stattfinden, wobei Rückkehr in Konformation I erfolgt, da die periphere SH-Gruppe ja wieder freigesetzt wird (d). Nach CAM-Beladung hingegen ist Konformation II fixiert (e); CAM-Enzym zeigt daher starke Decarboxylase-Aktivität, während freie Synthetase (in Konformation I vorliegend) Malonylreste nur sehr langsam decarboxyliert.

Im Zuge des Acyl-Transfers (a/b) und der Decarboxylierung durch CAM-Synthetase (e) muß von der zentralen SH-Gruppe bzw. dem CO_2 verlierenden Malonylrest noch ein Proton aufgenommen werden, das möglicherweise von einer weiteren, im aktiven Zentrum befindlichen Gruppe angeliefert wird; aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde dieser Schritt in Abb.42 weggelassen.

Denkbar wäre auch, daß das aktive Zentrum insgesamt eine negative Überschußladung besitzt, wie dies etwa für Chymotrypsin angenommen wird (208): dort besteht nach HARTLEY eine Wechselwirkung zwischen

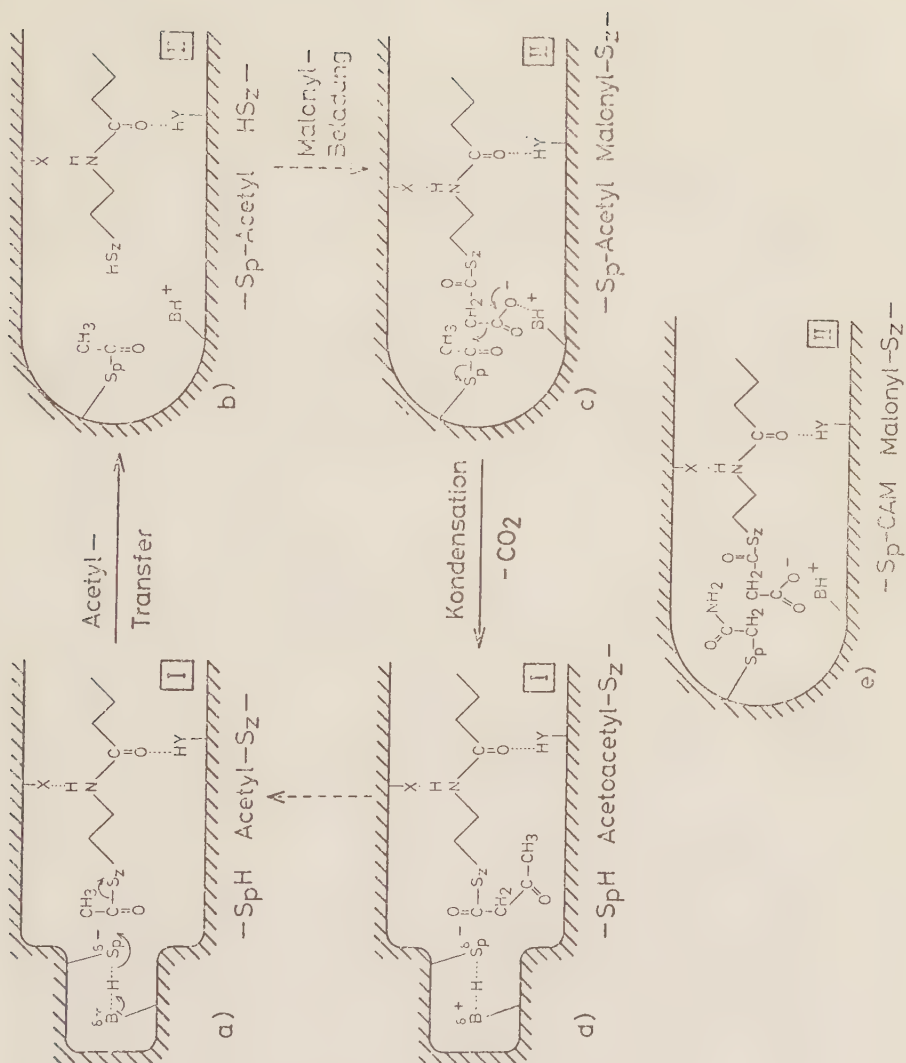


Abb.42 Hypothetisches Schema der Decarboxylierung von ACP-gebundenen Malonylresten

Erläuterungen vgl. Text.

einem Serin- und einem Histidinrest, der über das andere Stickstoffatom des Imidazolringes eine Wasserstoffbrücke zu einem Aspartat-Rest ausbildet. Die insgesamt vorhandene negative Ladung soll für die hohe Nucleophilie des Serin-Hydroxyls verantwortlich sein, die zur Spaltung der Peptidbindung des Substrates und zur intermediären Ausbildung einer Esterbindung führt. - Für die kondensierende Enzymkomponente würde die Annahme einer ähnlichen Struktur (mit dem Cystein-Thiol anstelle des Serin-Hydroxyls) einerseits zwanglos die hohe Reaktivität der peripheren SH-Gruppe gegen IAM erklären (etwa gleiche Geschwindigkeitskonstante wie für die Reaktion eines freien Thiolat-Anions, vgl. Kap.2.4), andererseits die für das Fehlen der Hemmung durch Jodessigsäure gegebene Erklärung bestärken (vgl. Kap.2.6.1). In Abb.42 wurde zwar (willkürlich) angenommen, daß die nach CAM-Beladung verbleibende positive Ladung an der Fixierung des Malonylrests mitwirkt; der negativ geladene Malonylrest könnte jedoch durchaus auch von einer neutralen -BH-Gruppe über eine Wasserstoffbindung festgehalten werden.

Der Unterschied der beiden, hier für den Mechanismus der IAM-induzierten Malonyl-Decarboxylierung angebotenen Hypothesen ist nur graduell: die Aufhebung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen peripherer SH-Gruppe und der postulierten basischen Gruppe wird in jedem Falle zu einer gewissen räumlichen Umordnung der Struktur des aktiven Zentrums führen.

Folgende Überlegung erhöht jedoch in unseren Augen die Attraktivität der Annahme einer signifikanten konformellen Umwandlung: aus Abb.42 wird deutlich, daß für die beiden Funktionen der kondensierenden Enzymkomponente (Acyl-Transfer von zentraler auf periphere SH-Gruppe und Kondensation unter Decarboxylierung, vgl. Kap.1.2, Abb.2) die gegenseitige sterische Anordnung von zentraler und peripherer SH-Gruppe verschieden sein muß. Beim Acyl-Transfer treten beide Schwefelatome zugleich mit demselben (Carbonyl-)Kohlenstoffatom in Wechselwirkung, ihr Abstand beträgt also etwa 2 C-S-Bindungslängen; beim Kondensationsschritt hingegen sollten insgesamt 4 Bindungslängen ($S_p-C-C-S_z$) zwischen ihnen liegen. Ein starres aktives Zentrum kann für beide Teilschritte sicher nicht optimal räumlich gestaltet sein.

Nimmt man an, daß am kondensierenden Teilenzym eine Bindungsregion

existiert, die mit dem 4'-Phosphopantetheinteil des ACP in Wechselwirkung tritt (etwa mit der Amidbindung zwischen den Cysteamin- und Pantoinsäurebausteinen, wie dies in Abb.42 schematisch angedeutet ist) und betrachtet man diesen Bereich als räumlich fixiert, so muß sich für optimale Wirksamkeit des Enzyms die relative Lage der peripheren SH-Gruppe zu dieser ACP-Bindungsregion in freiem (a) und acyliertem (b) Zustand unterscheiden. Dies aber bedeutet nichts anderes als die postulierte Konformationsänderung, bei der Acetyl-ACP mit einer anderen Konformation in Wechselwirkung tritt als Malonyl-ACP.

Zu der gleichen Folgerung kommt man, wenn man nicht eine Bindung des 4'-Phosphopantetheins, sondern des Strukturmerkmals der von der zentralen SH-Gruppe ausgehenden Thioesterbindung selbst an das kondensierende Teilenzym annimmt: auch die relative räumliche Lage von einer solchen thioester-spezifischen Bindungsstelle und von peripherer SH-Gruppe müßte für Acyl-Transfer und Kondensation unterschiedlich sein.

Die Annahme, daß überhaupt eine Bindungsstelle an der kondensierenden Enzymkomponente existiert, die die Substrate Acetyl-ACP bzw. Malonyl-ACP festhält, erscheint plausibel. Möglich wäre aber auch, daß der acetyl- oder malonyl-beladene "Schwingarm" frei in das aktive Zentrum eingreift und daß die Variabilität des Abstandes der beiden funktionellen Sulfhydrylgruppen durch Verkürzung dieses beweglichen Armes (der ja in verschiedener Weise gefaltet sein könnte) erfolgt. Eine experimentelle Möglichkeit zur Untersuchung dieser Hypothesen wären Versuche mit Modellsubstraten zur Substratspezifität der kondensierenden Enzymkomponente.

Auch hinsichtlich der möglichen energetischen Veränderungen, die hierbei erfolgen, wird die Hypothese einer substrat-induzierten Konformationsänderung weiterer Untersuchungen bedürfen. Arbeiten von SEUBERT (209) zeigten, daß eine Biosynthese von Fettsäuren energetisch auch aus AcetylCoA (ohne Beteiligung von MalonylCoA) möglich ist, wenn zur Reduktion des Zwischenproduktes Enoyl-Thioester zum gesättigten Acylrest nicht (wie beim oxydativen Fettsäureabbau) Flavine, sondern Pyridinnucleotide als Wasserstoffdonoren verwendet werden; dies ist jedoch auch bei dem durch die Fettsäuresynthetase katalysierten MalonylCoA-Weg der Fall (FAS dient lediglich als Zwischenträger des Wasserstoffs im Hefe-Enzym). Der thermodynamische Vorteil der "Kondensation unter Decarboxy-

lierung" (38) ist demnach nicht unbedingt erforderlich, um den Cyclus in Richtung auf die Synthese von Fettsäuren zu treiben. Zusammenhänge zwischen Substrat-Bindungsenergieen und Protein-Protein-Wechselwirkungen werden neuerdings diskutiert (210).

Zu erwarten ist, daß Malonyl-Decarboxylase-Aktivität auch durch andere SH-Reagentien als IAM hervorgerufen werden kann, sofern sie selektiv mit der peripheren SH-Gruppe reagieren und das zentrale Thiol unberührt lassen. Es wäre interessant zu untersuchen, welche sterischen Anforderungen an die Struktur des Reagens gestellt werden müssen, damit am katalytischen Prozess beteiligte Gruppen im aktiven Zentrum des kondensierenden Teil-enzymys nicht beeinträchtigt werden. Tatsächlich zeigten vorläufige Versuche, daß eine gewisse, signifikante, allerdings schwache Decarboxylase-Aktivität durch Behandlung der Synthetase mit 2-Brom-propionamid hervorgerufen werden kann (Abb.43). Kein anderes der in Kap.2.6.2 und 2.6.4 aufgeführten Reagentien bewirkte unter den dort angegebenen Bedingungen das Auftreten einer MalonylCoA-Decarboxylase-Aktivität, die stärker war als die des unbehandelten Enzyms.

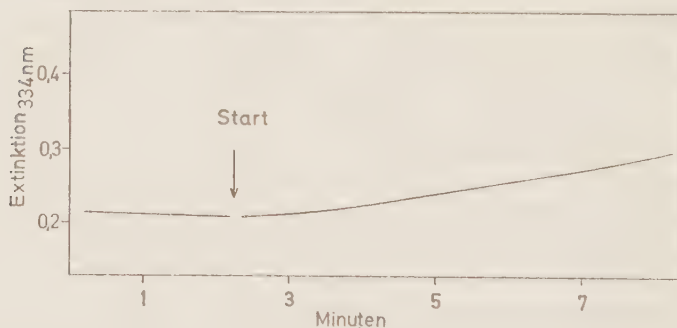


Abb.43 MalonylCoA-Decarboxylase-Aktivität nach Behandlung der Fettsäuresynthetase mit 2-Brom-propionamid

Ansatz: Synthetase (585 mE/mg; 2 mg/ml) und 20 mM 2-Brompropion-säureamid in 0,1 M K-PO₄, pH 6,5; 0°C, 60 min. Sodann wurden 0,35 ml (enthaltend 0,7 mg Enzym) im Decarboxylase-Test getestet.

7

Experimenteller Teil

7.1 Allgemeines

7.1.1 Verwendete Geräte

Flüssigkeits-Szintillationszähler, Modell 314 EX, Packard
Flüssigkeits-Szintillationszähler, Isocap 300, Nuclear Chicago
Radiopapierchromatograph FH 452 mit Strahlungsmeßgerät FH 49 und
Anpaßgerät FH 435 A, Priesecke und Rüpfer, und Linienreiber,
Metrawatt
Präparative Zentrifuge, W. Stock Maschinenbau KG
Automatic Superspeed Centrifuge RC-2, RC-2B und RC-5, Sorvall
Präparative Ultrazentrifugen, Modelle L und L 3-40, Beckman
Tischzentrifugen Typ UJ 0 und UJ 1, Christ
Zellhomogenisator, Hanton-Gaulin Manuf. Co.
Homogenisator "Zauberstab", ESGE
Photometer "Eppendorf" mit Transformationsstufe 1852, Netheler &
Hinz, und Kompensograph PR 2210 U/00, Philips
Spektralphotometer M 4 Q II mit T/E-Wandler, Zeiss
Kompensationsschreiber Servogor 3, Metrawatt
Fraktionskollektoren RadiRac und UltroRac, LKB
Durchflußphotometer Uvicord II mit Sechskanal-Punktschreiber, IFE
Schlauchpumpen Perpex, LKB
Elektrophoreseapparatur "Pherograph Original Frankfurt", Vetter
Hochspannungs-Elektrophorese-Tanks LT-48A, Savant
Hochspannungs-Gleichrichter HV-5000 A, Savant
Hochspannungs-Elektrophorese-Enclosure HVE-8036, Savant
Infrarot-Spektrometer, Modell 137, Perkin-Elmer
Rotationsverdampfer "Rotavapor R", Büchi
Analysenwaagen, Modelle H 20 T, P 5 und P 1210, Mettler
pH-Meter Typ pH 27, Knick, mit Glaselektroden, Ingold
Kofler-Heiztischmikroskop, Reichert
Rührmotor, Heidolph
Magnetrührer, Colora; Janke und Kunkel; Heidolph
Mixer REAX I, Heidolph
Mikroliterspritzen, Hamilton
Mikroliterpipetten "Eppendorf", Netheler & Hinz

7.1.2 Materialien

Handelsprodukte waren: GAPDH, Lactat-Dehydrogenase, Malat-Dehydrogenase, Citratsynthase, NAD^+ , NADH, NADPH, CoA (Boehringer, Mannheim); Serumalbumin vom Rind (Behringwerke, Marburg); DTT (Calbiochem, San Diego); Fluorescamin ("Fluram") (Hoffmann-La Roche, Basel); Natrium-glyoxylat (Roth, Karlsruhe); DTNB, NEM, Asparaginsäure, Histidin, Phenylisothiocyanat, PTH-Aminosäuren, Dansylchlorid (Fluka, Buchs); ϵ -DNP-Lysin, Chymotrypsin, DCC-Trypsin, Dowex (Serva, Heidelberg); Sephadex G-25 und G-50, DEAE-Sephadex (Pharmacia, Uppsala); Chlormethyl-phenyl-keton (Schering, Berlin); Aluminiumoxid, basisch und neutral (ICN-Woelm, Eschwege); Varsol (Esso-Münoco, München); N-Allyl-N,N-dimethyl-amin (Pierce, Rockford); Stickstoff, nachgereinigt (Linde, München).

Bäckerhefe (Hefe-Mayr, München).

Dünnschichtfolien, Mikropolyamid (Schleicher&Schüll, Dassel); Dialyseschlauch (Union Carbide Co., Chicago); Chromatographiepapier No.1,3,3MM (Whatman, Maidstone).

^{14}C -IAM (NEN, Boston; CEA, Gif-sur-Yvette; The Radiochemical Centre, Amersham); $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (The Radiochemical Centre, Amersham).

Für Synthesen verwendete Lösungsmittel technischer Reinheit (Methanol, Äthanol, Diäthyläther, Aceton, Toluol, Chloroform, Essigsäureäthylester, Petroläther) wurden von der Fa. Biesterfeld, Hohenbrunn, bezogen, nach Literaturvorschriften (211) gereinigt und ggf. absolutiert.

Alle übrigen Chemikalien und Dünnschichtmaterialien sowie TPCK-Trypsin stammten von Merck, Darmstadt, bzw. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, und besaßen die höchste erhältliche Reinheitsstufe.

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden mir:

^{14}C -AcetylCoA (Herstellung nach (212)) von Prof. OESTERHELT; γ -Crotonyl-N-acetyl-cysteamin (Herstellung nach (74)) von Herrn v. STUMPFEN. N-(Jodacetyl-aminoäthyl)-5-naphthylamin-1-sulfonsäure und N-(1-Pyrenyl)-maleinimid waren Geschenke von Prof. L. STRYER, Yale University, an Herrn Prof. OESTERHELT.

Eine Probe Pyrrolidonyl-Peptidase stellte mir Herr Dr. H. LILL, Fa.Boehringer, Tutzing, zur Verfügung.

Folgende Substanzen wurden nach den angegebenen Literaturvorschriften synthetisiert:

AcetylCoA (212); Gehaltsbestimmung nach (198); MalonylCoA und S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin (213); die Reduktion des Zwischenproduktes N,N'-Dicapryloyl-cystamin erfolgte mit NaBH_4 nach (214). Gehaltsbestimmung des MalonylCoA mit Fettsäuresynthetase nach (215); N-Acetyl-cysteamin (216); N,S-Diacetyl-cysteamin (217); S-Malonyl-N-acetyl-cysteamin (72); S-Acetoacetyl-N-acetyl-cysteamin (61). SCMC (218), Umkristallisieren aus H_2O ; SCMC-Sulfoxid (219); SCMC-Sulfon (220), Umkristallisieren aus H_2O ; SCMC-Lactam (105 oder 221), Umkristallisieren aus Eisessig/Äther; SCM-Cysteamin (222), Umkristallisieren aus Äthanol; SCAMC (68). Zur Herstellung von SCMC-Lactam-sulfon vgl. Kap.7.3.6.

2-Brom-propionsäureamid wurde aus 2-Brompropionsäure nach (223) gewonnen.

Dansyl-Aminosäuren (224); PTH-SCAMC (225).

IAM wurde vor Gebrauch aus Wasser oder Chloroform umkristallisiert und unter Lichtausschluß bei -20°C aufbewahrt; IAM-Lösungen wurden stets frisch angesetzt.

Cystein-Lösungen wurden unmittelbar vor Verwendung durch Mischen äquivalenter Mengen Cystein-Hydrochlorid- und KOH-Lösung hergestellt und nicht länger als einige Stunden benutzt.

7.1.3 Allgemeine analytische Methoden

7.1.3.1 Proteinbestimmung

Wir verwendeten entweder die Biuret-Methode (226) in der von OESTERHELT (61) angegebenen Form oder bestimmten die Proteinkonzentration durch Messung der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm nach WARBURG und CHRISTIAN (227); die Berechnung erfolgte hierbei nach der Näherungsformel (228)

$$\text{Proteinkonzentration (mg/ml)} = 1,55 E_{280 \text{ nm}} - 0,76 E_{260 \text{ nm}}$$

7.1.3.2 Radioaktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Radioaktivität von Lösungen wurden Aliquote auf Filterpapierstreifen (Whatman 1, 2,5 x 7 cm) aufgetragen, getrocknet und unter Toluol-Szintillationslösung (Zusammensetzung: 5 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 0,5 g 1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl-)benzol (Dimethyl-POPOP) in 1 l Toluol) im Flüssigkeits-Szintillationszähler gezählt. Bei Verwendung des Szintillations-Spektrometers Packard 314 EX betrug die Zählausebeute für ^{14}C bei diesem Verfahren 47% (96); für spätere Arbeiten stand ein Szintillationszähler Typ "Isocap" zur Verfügung, der es durch Ausdruck der in zwei geeichten Kanälen gezählten Impulse ermöglichte, die Zählausebeute für jede Probe an Hand einer Eichkurve zu bestimmen (229); sie lag im allgemeinen bei 75-79%.

Die Lokalisierung radioaktiver Substanzen auf Papierchromatogrammen und Elektropherogrammen erfolgte mit Hilfe eines Streifenzählers mit angeschlossenen Linienschreiber; das Papier wurde hierzu in Streifen von 3,5 bis 4 cm Breite zerschnitten. Auffindbar waren minimal ca. 3000 cpm (Whatman 1-Papier). In einigen Fällen (vgl. Legenden zu den Abbildungen) wurden die Chromatogramme in kleine Streifen bzw. Quadrate zerschnitten und die Radioaktivität im Flüssigkeits-Szintillationszähler ermittelt.

7.1.4 Verzeichnis der verwendeten Laufmittelsysteme

Tabelle 13 Verzeichnis der für Papier- und Dünnschichtchromatographie verwendeten Laufmittel

Laufmittel	Zusammensetzung
A	tert. Butanol: Ameisensäure: Wasser = 14:3:3 v/v
C	n-Butanol: Essigsäure: Wasser = 4:1:1 v/v
E	Essigsäureäthylester: Pyridin: Essigsäure: Wasser = 5:5:1:3 v/v
F	n-Butanol: Pyridin: Essigsäure: Wasser = 15:10:3:12 v/v
I	Dichloräthan: Essigsäure = 60:7 v/v
IV	Heptan: n-Butanol: 75% Ameisensäure = 50:30:9 v/v
V	Heptan: Propionsäure: Dichloräthan = 58:17:25 v/v
Dansyl 1	1,5% Ameisensäure in H_2O
Dansyl 2	Toluol: Essigsäure = 10:1 v/v
Dansyl 3	Essigsäureäthylester: Methanol: Essigsäure = 20:1:1 v/v

7.1.5 Anreicherung und Test von Fettsäuresynthetase

7.1.5.1 Anreicherung: Die Synthetase wurde aus käuflicher Bäckerhefe gewonnen. Die Anreicherung erfolgte nach (61) mit den von SCHRECKENBACH (120) beschriebenen Modifikationen. Die Aktivität so erhaltener Synthetase betrug im allgemeinen 1500 bis 2500 ml/mg; sie wurde durch Zusatz von Ammoniumsulfat bis zur Sättigung (100%) ausgefällt und in 0,1 M $K-IO_4$, pH 6,5, 1 mM DTT, bei -20° aufbewahrt. Vor Verwendung wurde das Enzym entweder durch Gelfiltration an Sephadex G-25 oder durch Ultrazentrifugation von Ammoniumsulfat und Thiol befreit.

Proben Fettsäuresynthetase aus Bierhefe stellten mir freundlicherweise Herr.Dr.T.SCHRECKENBACH und Herr F.WIELAND, MPI für Biochemie, zur Verfügung. Die in Kap.5.2 verwendeten Enzympreparationen aus Hefe-Mutanten wurden im Arbeitskreis von Herrn Prof.Dr. E.SCHWEIZER, Universität Würzburg, angereichert.

7.1.5.2 Synthetase-Standardtest

Standardtest A: Eine Küvette (d=1 cm) enthielt im Gesamtvolumen 1 ml: 100 μ Mol $K-PO_4$, pH 6,5; 20 μ Mol Cystein; 0,4 mg Serumalbumin; 80 nMol NADPH; 40 nMol NADH; 100 nMol AcetylCoA und 2 - 10 μ g Synthetase. Nach Aufnahme des Blindlaufs über zwei bis drei Minuten wurde der Test durch Zugabe von 120 nMol MalonylCoA gestartet.

Standardtest B (mit Modellsubstraten): Ansatz wie Test A, aber 3 μ Mol N,S-Diacetylcysteamin anstelle von AcetylCoA; Start mit 600 nMol S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin anstelle von MalonylCoA.

Gemessen wurde die Extinktionsänderung bei 334 nm und Zimmertemperatur; molarer Extinktionskoeffizient von NADPH bzw. NADH: $6,18 \cdot 10^3$ l/Mol.cm (230). Als 1 Enzymeinheit (E) gilt diejenige Enzymmenge, die unter den Testbedingungen 1 μ Mol MalonylCoA (bzw. S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin) pro Minute umsetzt; dies entspricht dem Verbrauch von 2 μ Mol reduziertem Pyridinnucleotid pro Minute. Ausnahme: in den Versuchen von Kap.6.2, Abb.38, wurde die Enzymaktivität auf den Verbrauch von AcetylCoA bezogen, um die Werte unmittelbar mit der Malonyl-Decarboxylase-Aktivität vergleichen zu können; zur Umrechnung vgl. Kap.6.2.

Die Verwendung der Modellsubstrate (Standardtest B) ist einerseits

aus ökonomischen Gründen vorteilhaft, andererseits wegen der größeren Stabilität und bequemerer Reinigung der Modellsubstrate günstig. In Übereinstimmung mit SUMPER (65) fanden wir, daß mit den Modellsubstraten ca. 70% der mit AcetylCoA und MalonylCoA gemessenen Maximalgeschwindigkeit erreicht werden; als Michaelis-Konstanten für die Modellsubstrate fanden wir (jeweils mit den oben angegebenen Konzentrationen des anderen Substratmodells)

- für N,S-Diacetylcysteamin: $K_m = 0,2 \text{ mM}$ (in Übereinstimmung mit (65))
- für S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin: $K_m = 75 \mu\text{M}$ ((65): $150 \mu\text{M}$)
- für S-Malonyl-N-acetyl-cysteamin: $K_m = \text{ca. } 0,25 \text{ mM}$; wir erreichten mit diesem Modellsubstrat aus unbekannten Gründen nur ca. 60% der mit AcetylCoA und MalonylCoA gefundenen Synthetase-Aktivität.

Etwas problematisch ist die geringe Löslichkeit des Modellsubstrats S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin; wir verwendeten Lösungen der Konzentration 4 mM (1,16 mg/ml), die bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden (die Substanz löst sich in dieser Konzentration, wenn die Mischung über Nacht bei 30°C magnetisch gerührt wird). Diese Substratlösung konnte stets nur einige Wochen verwendet werden; bei längerer Aufbewahrung fanden wir erhöhte Werte für die Synthetase-Aktivität ohne N,S-Diacetylcysteamin (vermutlich durch sehr langsame CO_2 -Abspaltung aus dem Modellsubstrat bei Zimmertemperatur).

In Übereinstimmung mit Ergebnissen von BLOCH (231) und WEITHMANN (43) stellten wir fest, daß das ursprünglich (74) als alleiniges Reduktionsmittel verwendete NADPH teilweise durch NADH ersetzt werden kann. Die erreichbare Maximalgeschwindigkeit wird hierdurch nicht erhöht, jedoch mißt man maximale Enzymaktivität in Anwesenheit von NADH und NADPH schon bei geringeren Gesamtkonzentrationen an reduziertem Pyridinnucleotid als beim Test mit NADPH allein. Auf Grund der hierdurch gegebenen ökonomischen sowie insbesondere meßtechnischen Vorteile (geringere optische Dichte der Testlösung!) setzten wir generell beide Pyridinnucleotide in den oben angegebenen Konzentrationen ein. Lediglich in Rohextrakten (erste Stufen der Anreicherung) war es nicht möglich, in dieser Weise zu verfahren; wohl wegen der Anwesenheit von NADH-oxydierenden Enzymen ergaben sich extrem starke Blindlaufwerte. In diesem Fall wurde kein NADH, jedoch 200 nMol NADPH eingesetzt (gleiche Aktivität).

In dieser Arbeit angegebene Enzymaktivitätswerte beziehen sich - sofern nicht anders angegeben - auf Standardtest B.

7.1.5.3 Fettsäuresynthese aus S-Crotonyl-N-acetyl-cysteamin

Beim Test der 2,3-Dehydroacyl-Reduktase-Komponente der Synthetase werden das Modells substrat S-Crotonyl-N-acetyl-cysteamin sowie NADPH eingesetzt und die Extinktionsabnahme bei 334 nm gemessen (37). ZIEGENHORN bemerkte, daß beim Zusatz von MalonylCoA zum Reaktionsgemisch eine starke Steigerung des NADPH-Verbrauchs stattfand; er vermutete, das Modells substrat sei (analog zu IAM) in der Lage, mit der vermuteten "decarboxylase-aktivierenden" Bindungsstelle in Wechselwirkung zu treten und so die Synthese von Fettsäuren aus MalonylCoA zu ermöglichen (71).

Wir konnten diesen Befund bestätigen (Abb.44); infolge der bewiesenen Nichtexistenz der "Aktivatorstelle" mußte zu seiner Erklärung eine andere Theorie gefunden werden.

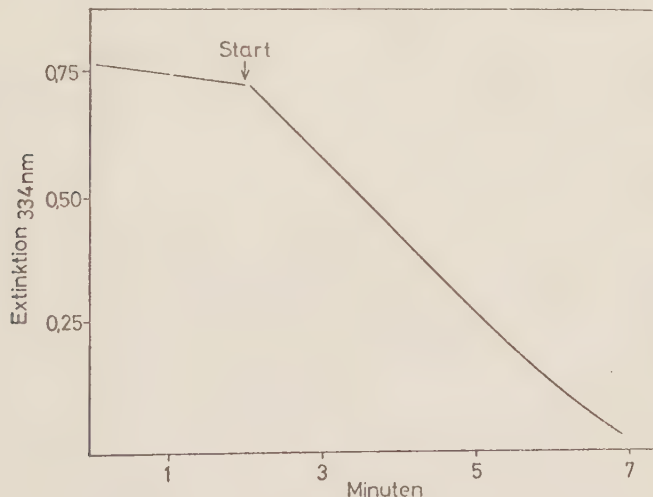


Abb.44 Fettsäuresynthese aus S-Crotonyl-N-acetyl-cysteamin

Ansatz: Standardtest B mit 45 μ g Synthetase; 30 μ Mol S-Crotonyl-N-acetyl-cysteamin statt N,S-Diacetylcysteamin. Start mit S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin.

Wir charakterisierten die Reaktion durch ihre Enzymabhängigkeit (Abb.45) und die Substratabhängigkeit von S-Crotonyl-N-acetyl-cysteamin (Abb.46); aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm (Abb.46) ergab sich die Michaeliskonstante für das Modells substrat zu $K_m = 11$ mM. Dieser Wert stimmt in zufriedenstellender Weise mit

denjenigen überein, die mit Hilfe des Enoyl-Reduktase-Tests gefunden wurden ($K_m = 5 \text{ mM}$ (43) bzw. 28 mM (54)). Der zeichnerisch gefundene Wert für die Maximalgeschwindigkeit betrug 301 mE/mg und erreichte somit 67% der im Standardtest B gemessenen Synthesetaseaktivität des Enzympräparates mit N,S-Diacetylcysteamin und S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin (501 mE/mg).

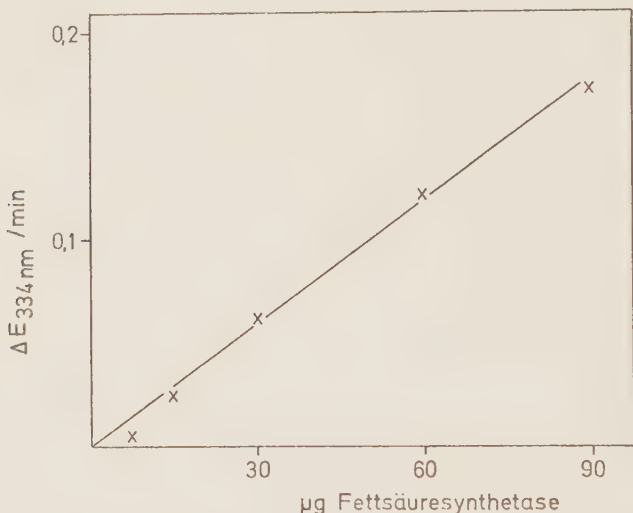


Abb.45 Enzymabhängigkeit der optischen Bestimmung der Synthetase-Aktivität mit S-Crotonyl-N-acetyl-cysteamin

Ansatz vgl. Legende zu Abb.44, angegebene Mengen Synthetase

Mehrere Erklärungen wären für die starke Zunahme des NADPH-Verbrauchs bei Malonyl-Thioester-Zusatz denkbar:

- Wir können nicht ausschließen, daß MalonylCoA (bzw. S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin) auf bisher unbekanntem Wege zu starker Stimulierung der Enoyl-Reduktaseaktivität Anlaß gibt, ohne daß Fettsäuresynthese stattfindet. Diese gewiß sehr unwahrscheinliche Möglichkeit läßt sich prinzipiell unter Verwendung radioaktiver Substrate durch Analyse der Reaktionsprodukte überprüfen (wir führten keine Produktanalyse durch, können also keine Aussage machen, ob Fettsäuren gebildet werden).

- Nach Reduktion des Crotonylrestes entstandenes S-Butyryl-N-acetyl-cysteamin könnte (wie N,S-Diacetylcysteamin) als Starter der Fett-

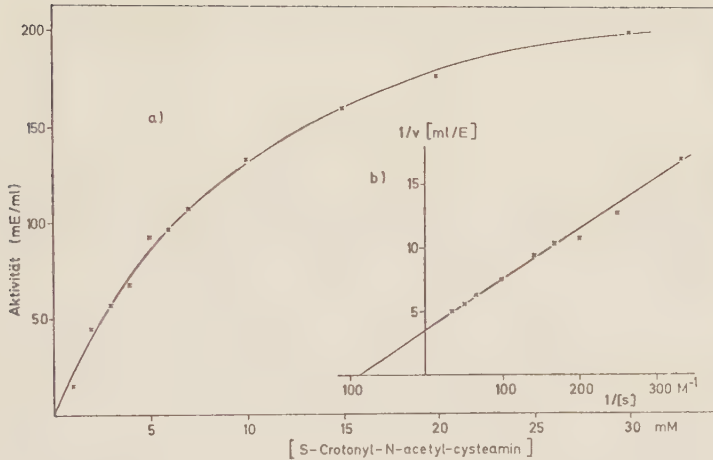


Abb.46 Substratabhängigkeit der optischen Bestimmung der Synthetase-Aktivität mit S-Crotonyl-N-acetyl-cysteamin

Ansatz vgl. Legende zu Abb.44, angegebene Mengen S-Crotonyl-N-acetyl-cysteamin; a) Normalauftragung, b) LINEWEAVER-BURK-Diagramm

säuresynthese verwendet werden. PIRSON fand jedoch, daß gerade der Butyrylrest die geringste Fähigkeit aufweist, als Starter der Synthese zu fungieren (39, 235). Allerdings wurde von ihm ButyrylCoA als Starter maximal in der Konzentration 0,2 mM eingesetzt; bei entsprechenden Werten ist auch mit dem Modellsubstrat nahezu keine Aktivität meßbar. Bei der hohen verwendeten Konzentration - auch 30 mM S-Crotonyl-N-acetyl-cysteamin bewirkten noch keine völlige Enzymsättigung (Abb.46)! - könnten durchaus die gefundenen hohen NADPH-Verbrauchsraten erreicht werden.

- Schließlich könnte der Crotonylrest direkt von einer der im Komplex vorhandenen Transferasen auf das Enzym übertragen werden. Frühere Versuche zeigten, daß mit 0,2 mM CrotonylCoA als Starter ca. 5% der maximalen Synthetase-Aktivität gemessen werden konnten (SCHWEIZER, (67)) und daß auch beim Start mit 2-DecenoylCoA ca. 4% der beim Start mit DecanoylCoA gefundenen Aktivität erreicht wurden (PIRSON, 39). Aus Abb.46 geht hervor, daß auch mit S-Crotonyl-N-acetyl-cysteamin bei Konzentrationen unter 1 mM nur wenige Prozent Aktivität gefunden wurden; bei hohen Konzentrationen hingegen ist offensichtlich auch Crotonyl-Thioester ein recht guter Starter der Fettsäuresynthese.

7.2 Versuchsbeschreibungen zu Kap.2

7.2.1 Inhibierung der Synthetase durch IAM

Allgemeiner Ansatz: Fettsäuresynthetase (Konzentration beliebig) wurde in $0,1 \text{ M K-PO}_4$, pH 6,5, bei 0°C mit den jeweils angegebenen Konzentrationen IAM inkubiert. Zur Verfolgung der Hemmung wurden nach den angegebenen Zeiten Aliquote auf Synthetase-Aktivität getestet. Methoden zur Beendigung der Reaktion vgl. Kap.2.3.2.

Hemmungskinetik: Synthetase (844 mE/mg im Standardtest A; $1,6 \text{ mg/ml}$); 1 mM IAM . Zur Untersuchung des Acetyl-Schutzes wurde das Enzym für 5 min bei 0°C mit 1 mM AcetylCoA vorinkubiert und anschließend der Hemmstoff zugesetzt.

7.2.2 Gehemmte Teilreaktion

Ansatz: Synthetase (970 mE/mg ; $1,83 \text{ mg/ml}$); $0,5 \text{ mM IAM}$; $0,1 \text{ M K-PO}_4$ pH 6,5, 0°C . Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquote ($5\text{--}500 \mu\text{l} = 9\text{--}900 \mu\text{g}$) im Standardtest B auf Synthetaseaktivität untersucht bzw. je $340 \mu\text{l}$ ($622 \mu\text{g}$) dem Kondensationstest unterworfen.

Kondensationstest (43,74): Bei 25°C wurden im Gesamtvolumen $0,16 \text{ ml}$ vorinkubiert: $50 \mu\text{Mol Tris-HCl}$, pH 7,5; $5 \mu\text{Mol Cystein}$; $5 \mu\text{Mol K-EDTA}$; $0,15 \mu\text{Mol CoA}$; $30 \mu\text{Mol S-Acetoacetyl-N-acetyl-cysteamin}$ und $2 \mu\text{Mol NaH}^{14}\text{CO}_3$ (57 mCi/mMol). Nach 3 min erfolgte Zugabe von $0,34 \text{ ml}$ Enzymlösung; nach weiteren 20 min wurden unter dem Abzug $0,2 \text{ ml}$ Eisessig zugesetzt, von der erhaltenen Lösung (Gesamtvolumen $0,7 \text{ ml}$) $0,6 \text{ ml}$ auf Papier aufgetragen und nach Trocknung (Abzug) die Radioaktivität bestimmt. Der vorher gemessene Blindwert (ohne Enzym) wurde abgezogen.

7.2.3 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion von Cystein mit IAM (0°C , pH 6,5)

Die Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte mit Hilfe von 5,5'-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure) (ELLMAN's Reagens, DTNB). Dieses aromatische Disulfid reagiert im Alkalischen mit Thiolen unter Bildung eines gelb gefärbten Anions (VI); die Farbintensität ist der Thiolkonzentration proportional (232) (Gleichung 26). Da der molare Extinktionskoeffizient des Anions (VI) in starkem



(Gleichung 26)

(VI)

Maße von den Versuchs- und Gerätebedingungen abhängig ist (233), benutzten wir zur Bestimmung der Cystein-Konzentration mit DTNB eine Eichkurve; wie sich zeigte, bestand unter unseren Testbedingungen (s.u.) Linearität zwischen der eingesetzten Cysteinmenge und der gemessenen Extinktion bei 405 nm mindestens zwischen 10 und 100 nMol Cystein im Test (Konzentration 5 bis 50 μM).

Versuchsansatz: Die Reaktionsmischung enthielt je 8 mM Cystein und IAM, ferner 48,8 mM K- PO_4 , pH 6,5; Temperatur 0°C. Alle fünf min wurden 0,05 ml der Mischung entnommen und in eine Küvette pipettiert, die außerdem (in Form einer nicht länger als 3 Stunden benutzten Stammlösung) enthielt: 200 μMol K- PO_4 , pH 8,0; 0,2 ml DTNB-Lösung (15,4 mg/50 ml Aceton) sowie 1,55 ml H_2O . Gemessen wurde die Extinktion bei 405 nm gegen einen Blindwert (ohne Cystein); aus der Eichkurve wurde hieraus die zum jeweiligen Zeitpunkt noch vorhandene Cysteinmenge entnommen.

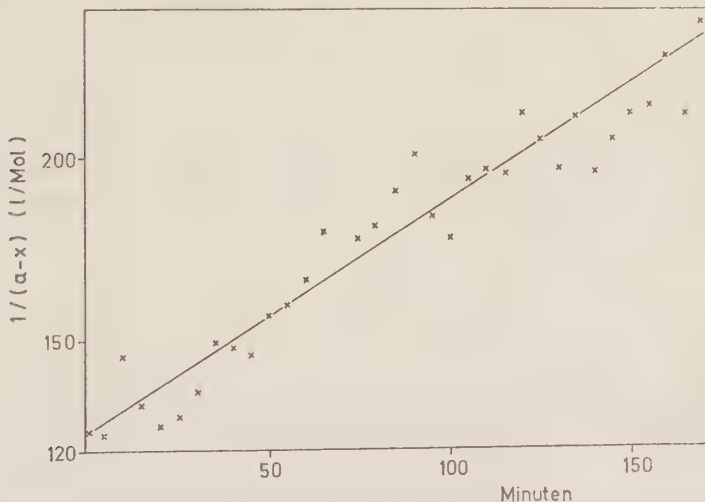


Abb. 47 Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Umsetzung von Cystein mit IAM bei 0°C und pH 6,5

Berechnung: Bei bimolekularen Reaktionen mit gleichen Anfangskonzentrationen a beider Reaktionspartner gilt (mit x = Umsatz zur Zeit t) (234):

$$\frac{1}{a - x} - \frac{1}{a} = kt \quad (\text{Gleichung 27})$$

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten wurde daher der reziproke Wert der zur Meßzeit noch vorhandenen Cystein-Konzentration (diese ist $a-x$) gegen die Zeit aufgetragen (Abb.47). Die Steigung der erhaltenen Geraden lieferte $k = 0,010 \pm 0,006 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$.

7.2.4 Stöchiometrie der IAM-Beladung

Die Stöchiometrie der Grenzbeladung der Synthetase mit CAM-Resten wurde in mehreren Ansätzen überprüft. Hierzu ließ man Fettsäuresynthetase nach Kap.7.2.1 mit $[1-^{14}\text{C}]$ IAM reagieren, bis keine Aktivität mehr meßbar war. Nach Abtrennung des überschüssigen Hemmstoffes bei 4°C durch Sephadex G-25-Filtration wurde das Protein durch Zusatz von TCE (Endkonzentration $0,3 \text{ M}$) ausgefällt, abzentrifugiert, mehrmals gewaschen und getrocknet. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde der Niederschlag entweder in Ameisensäure gelöst und Aliquote dieser Lösung zur Szintillationszählung und Proteinbestimmung verwendet, oder wir verwendeten das TCE-denaturierte CAM-Enzym direkt zur Proteinbestimmung (Biuret-Methode) und zählten anschließend Aliquote aus der blauen, protein- und biuret-reagens-haltigen Lösung im Szintillationsspektrometer; die Zählausbeute erreichte hierbei 96% des aus farblosen, wässrigen Lösungen erhaltenen Wertes.

7.2.5 Wirkung anderer SH-Reagentien

Die Versuchsanordnungen folgten dem für IAM angewandten Verfahren (Kap.7.2.1); Einzelheiten sind den Legenden zu den Tabellen bzw. Abbildungen zu entnehmen. Lösungsmittel für die Reagentien: 1,5-I-AEDANS und NBD-Chlorid in Phosphatpuffer, N-Pyrenyl-maleinimid in Dioxan, Phenylmethan-sulfonylfluorid in Aceton, Bromessigsäureäthylester, Chlormethyl-phenylketon, Trichloracetonitril und N-(4-Dimethylamino-3,5-dinitrophenyl)-maleinimid in Äthanol. Restaktivitätsangaben beziehen sich auf Kontrollproben des ungehemmten Enzyms mit der betreffenden Menge des Lösungsmittels.

7.3 Versuchsbeschreibungen zu Kap.3

7.3.1 Salzsaurer Proteinhydrolyse

Die Spaltung von Proteinen mit HCl führten wir in der von MOORE und STEIN angegebenen Weise durch (99). Das denaturierte Protein wurde hierzu in dickwandige Zentrifugengläser überführt, die vorher gründlich mit Chromschwefelsäure und dest. Wasser gereinigt worden waren, und in 1-2 ml 5,7 N HCl gelöst (konz. HCl 1:1 mit H₂O verdünnt, über SnCl₂ bei Normaldruck zweimal destilliert und in einer dunklen Flasche unter Zusatz einiger Kristalle Phenol aufbewahrt); bei Hydrolysen, die zur Aminosäure-Analyse durchgeführt wurden, wurde noch ein Kristall Phenol zugesetzt (zum Schutz empfindlicher Aminosäuren nach (236)). Die Gläser wurden dann verengt (Gebläse), evakuiert (Ölpumpe), im Aceton/Trockeneis-Bad eingefroren, vorsichtig bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut und unter Vakuum abgeschmolzen. Hydrolysebedingungen: 20 h bei 110°C. Nach Abkühlen wurden die Bomben geöffnet, ihr Inhalt am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht und in einem geeigneten Volumen Wasser bzw. Puffer gelöst.

7.3.2 Papierchromatographie

Wir arbeiteten stets mit der absteigenden Methode; verwendet wurde für analytische Versuche Whatman No.1-Papier, für präparative Ansätze (Peptidreinigung, vgl. Kap.4) Whatman No. 3 MM-Papier. Die Proben wurden punkt- oder strichförmig aufgetragen; der seitliche Abstand zu den Blatträndern betrug 5 cm, die Laufstrecken im allgemeinen 25 bis 35 cm. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte bei Zimmertemperatur und nahm - je nach verwendetem Laufmittel und Papier - ca. 5 bis 20 h in Anspruch. Verwendete Laufmittel vgl. Kap.7.1.4; die Kammern wurden mit den Dämpfen des jeweiligen Laufmittelsystems vor der Chromatographie äquilibriert. Nach Beendigung des Laufes wurden die Bögen bei 30-70° getrocknet; alle Papierbögen, die zur Trennung von Peptiden oder Aminosäuren verwendet wurden, wurden nur mit Handschuhen berührt. Referenzsubstanzen liefen stets auf dem gleichen Blatt.

Die Lokalisierung nicht-radioaktiver Substanzen auf Papier erfolgte mit Hilfe folgender Reagentien:

- Bromkresolgrün (für saure Verbindungen: SMC-Lactam, SMC-Lactamsulfon): 0,3 % Bromkresolgrün in 80% Methanol lösen, so viele

Tropfen 5 N NaOH zusetzen (ca. 5 Tropfen/100 ml), daß auf dem getrockneten Chromatogramm ein grüner Untergrund erhalten wird, auf dem gelbe Flecken sichtbar werden (237). Empfindlichkeit: ca. 80 µg SCMC-Lactam auf Whatman 1-Papier und einer Fläche von ca. 1 cm².

- Ninhydrin (für Aminosäuren): 0,3 g Ninhydrin in der Mischung aus 100 ml n-Butanol und 3 ml Eisessig lösen und unter Lichtausschluß aufbewahren (238). Das Papier wurde nach Ansprühen mit dem Ninhydrin-Reagens einige Minuten auf 80-100°C erhitzt. Empfindlichkeit: ca. 10 nMol Aminosäure sind erkennbar.

- Fluorescamin ("Fluram"^R): nach SCHRECKENBACH (120) wurde Fluorescamin nicht als Sprüh-, sondern als Tauchreagens verwendet. Der Streifen wurde durch die Lösung von 1 mg Fluorescamin in 10 ml dest. Aceton (1% Pyridin) gezogen, bei Zimmertemperatur getrocknet und anschließend unter UV-Licht (350 nm) betrachtet. Weniger als 1 nMol Peptid war erkennbar.

Zur Lokalisierung radioaktiver Substanzen vgl. Kap.7.1.3.2.

7.3.3 Perameisensäure-Oxydation

Wir befolgten exakt die Vorschrift von OESTERHELT (61): 8 ml Ameisensäure werden mit 1 ml H₂O und 1 ml 30% H₂O₂ gemischt und 1 h bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das zu oxydierende Substrat wird sodann in 1-2 ml dieser Mischung gelöst und 4 h im Eisbad gehalten. Anschließend wird das Reagens am Rotationsverdampfer entfernt (Badtemperatur bis 35°C) und der Rückstand in Wasser gelöst.

7.3.4 Reaktion von GAPDH mit ¹⁴C-IAM

Die radioaktive Carboxamidomethylierung von GAPDH (aus Kaninchenmuskeln, EC 1.2.1.12) wurde exakt nach (100) durchgeführt: 6 mg GAPDH wurden in 6 ml 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 gelöst und auf 0°C gekühlt. Dann wurden 500 nMol [¹⁴C]IAM (18,4 mCi/mMol), gelöst in 1,5 ml Puffer, zugegeben und die Mischung 4 h im Eisbad stehen gelassen. Nach Zugabe von 22,5 ml eiskaltem Aceton, das 0,3 Vol-% 6 N HCl enthielt, wurde der Proteinniederschlag abzentrifugiert und zweimal mit Aceton gewaschen; der Überstand enthielt dann keine Radioaktivität mehr. Das beladene Enzym (spez. Beladung 0,4 CAM-Reste pro Molekül) wurde dann wie beschrieben hydrolysiert, PAS-oxydiert und papierchromatographisch untersucht.

7.3.5 Versuch des Ausfällens von "X" als Ca-Oxalat

20 000 cpm PAS-oxydiertes Hydrolysat von ^{14}C -CAM-Synthetase wurden zu einer wässrigen Lösung von Oxalsäure (46 mg $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1,5 ml Wasser) gegeben. Das nach Zugabe von 0,5 ml gesättigter wässriger CaCl_2 -Lösung ausgefällte Calciumoxalat wurde abzentrifugiert, zweimal mit H_2O gewaschen und dann in 1 ml 2 N HCl gelöst. 0,1 ml der Lösung enthielten 30 cpm; Blindwert 27 cpm. "X" war offensichtlich nicht mit Ca-Oxalat ausgefällt worden.

7.3.6 Herstellung von SCMC-Lactam-sulfon

SCMC-Lactam-sulfon wurde aus SCMC-Lactam durch PAS-Oxydation hergestellt (Bedingungen vgl. Kap.7.3.3) und aus Äthanol/Wasser umkristallisiert (mäßige Ausbeute). Die weiße, in Wasser mit saurer Reaktion gut lösliche Substanz (keine Farbreaktion mit Ninhydrin) schmolz bei $212\text{--}213^\circ\text{C}$ (Zersetzung). IR-Spektrum: Abb.48.

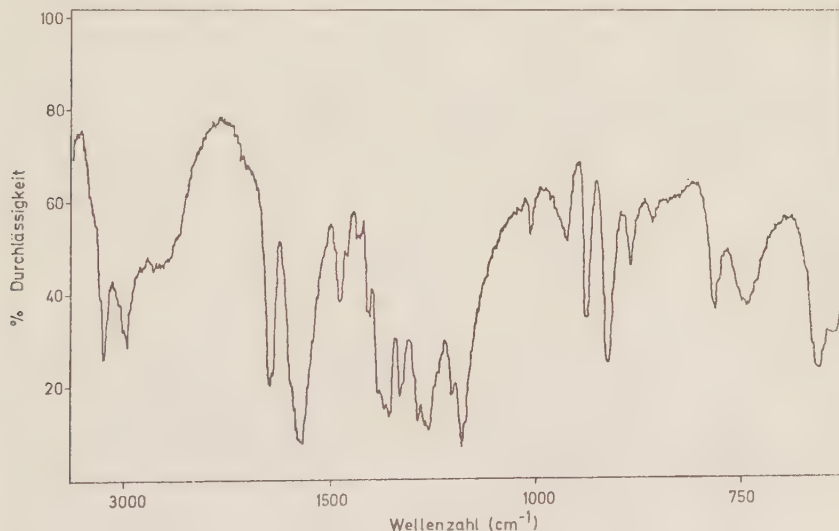


Abb.48 IR-Spektrum von SCMC-Lactam-sulfon

Analyse: C, 31,28% (Theorie 31,09%); H, 3,76% (Th. 3,65%); N, 6,53% (Th. 7,25%). Die Analyse wurde im Mikrolabor des Instituts für Org. Chemie der Univ. München (Leitung Herr H.SCHULZ) durchgeführt.

SCMC-Lactam-sulfon wurde unseres Wissens bisher nicht beschrieben.

7.3.7 Hochspannungs-Papierelektrophorese von "X"

Die elektrophoretische Untersuchung des Hydrolysats von ^{14}C -CAM-Synthetase wurde in einer Flachbett-Apparatur nach WIELAND und PFLEIDERER vorgenommen. Papier: Whatman No.3; Pufferlösungen:

- pH 3,5: 100 ml Essigsäure, 10 ml Pyridin, 890 ml H_2O
- pH 6,1: 10 ml Essigsäure, 100 ml Pyridin, 890 ml H_2O .

Arbeitsspannung 1500 V; Trennstrecke 27,3 cm (Spannungsgefälle 55 V/cm); Laufzeit 60 min. Die Substanzen wurden auf das trockene Papier aufgetragen, der Bogen anschließend mit dem Elektrodenpuffer befeuchtet, in die Apparatur eingelegt, mit einer Glasplatte beschwert und der Elektrophorese unterworfen. Anfärbung der Vergleichssubstanzen und Lokalisierung der Radioaktivität wie Kap.7.3.2.

Zur Elektrophorese in Michl-Tanks, vgl. Kap.7.4.5.

7.3.8 Proteinhydrolyse mit H_2SO_4

20 mg ^{14}C -CAM-Synthetase wurden unter den in Kap.7.3.1 für die salzsaure Spaltung beschriebenen Bedingungen mit 6 N H_2SO_4 behandelt. Nach der Hydrolyse wurde die Schwefelsäure durch Zusatz eines Überschusses 2 N $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ausgefällt; das niedergeschlagene BaSO_4 wurde abzentrifugiert und in den klaren Überstand CO_2 eingeleitet, bis die Abscheidung der überschüssigen Ba^{++} -Ionen als BaCO_3 vollständig war. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht, in H_2O gelöst und papierchromatographisch untersucht; ein Anteil wurde vor der Chromatographie mit PAS oxydiert. Im nicht-oxydierten Hydrolysat zeigte die gesamte Radioaktivität identisches Verhalten wie reines SCMC, während im PAS-oxydierten Spaltungsgemisch der einzige radioaktive Gipfel des Papierchromatogramms sich an der Stelle von SCMC-Sulfon befand.

7.3.9 Bildungsbedingungen für SCMC-Lactam-sulfon

Eingesetzt wurden jeweils 10 μMol SCMC (bzw. SCMC-Sulfoxid oder SCMC-Sulfon), ggf. 20 μMol H_2SO_4 und 50 μMol KX ($\text{X}=\text{F}, \text{Br}, \text{I}, \text{CN}, \text{SCN}, \text{N}_3$) in 1 ml Perameisensäure bzw. Ameisensäure. Bedingungen und Aufarbeitung wie Kap.7.3.3.

7.3.10 Decarboxylierung von SCMC-Sulfon

Die Substanzmischung aus 12 000 cpm PAS-oxydierter ^{14}C -CAM-Synthetase und 5 mg SCMC-Sulfon wurde in 10 ml 6 N HCl gelöst und in einem Rundkolben für 20 h auf 110°C erhitzt; der Kolben war mit einem Rückflußkühler versehen, der mit einem in 1,5 ml 4 N KOH eintauchenden Gasableitungsrohr verschlossen war. Vor Beginn des Versuchs wurde die Apparatur mit CO_2 gespült, ebenso bei Beendigung der Hydrolyse. Aufgefangen in der Vorlage wurden 6250 cpm (52%) der eingesetzten Radioaktivität.

7.3.11 Pyruvatbestimmung nach HCl-Behandlung von SCMC-Sulfon

10,2 mg ^{14}C -SCMC (57 μMol ; 140 000 cpm) wurden mit PAS zu ^{14}C -SCMC-Sulfon oxydiert und wie üblich den Bedingungen der HCl-Hydrolyse unterworfen; Restradioaktivität der Lösung: 85 000 cpm (ca. 60%). Nach Einrotieren und Aufnahmen in H_2O wurden Aliquote dem enzymatischen Pyruvattest mit Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) unterzogen (Bedingungen: (239)); wir fanden im Mittel das Vorhandensein von 5,4 μMol Pyruvat. d.h. 9,5% des eingesetzten SCMC-Sulfons. Kontrollen zeigten, daß in Lösungen von SCMC, SCMC nach HCl-Behandlung sowie SCMC nach HCl-Behandlung und darauffolgender PAS-Oxydation kein Pyruvat nachzuweisen war.

7.4 Versuchsbeschreibungen zu Kap.4

7.4.1 Tryptische Spaltung

Bedingungen: 0,1 M Tris-HCl, pH 8,1, 1 mM Ca^{++} ; oder 0,05 M Collidin-Acetat, pH 7,8. Proteinkonzentration ca. 6-10 mg/ml; Trypsinkonzentration wie im Text angegeben. Verwendet wurde im allgemeinen käufliches, TPCK-behandeltes Trypsin. Das denaturierte Protein wurde im Puffer fein suspendiert und die Mischung während der Spaltung magnetisch gerührt. Inkubationsdauer 20 h; Temperatur wie angegeben. Im allgemeinen entstanden unter diesen Bedingungen klare Lösungen; wenn in manchen Fällen ein Teil des Materials ungelöst blieb, wurde er abzentrifugiert und

ggf. erneut mit Trypsin behandelt. Nach der Spaltung wurde die Lösung entweder direkt zur DEAE-Sephadex-Chromatographie verwendet (vgl. Kap.4.4.4) oder nach Zusatz von Eisessig bis pH 3 am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht (Badtemperatur bis 35°C) und anschließend im jeweiligen Säulenpuffer gelöst.

7.4.2 Säulenchromatographie

7.4.2.1 Allgemeines Verfahren

Als Säulen dienten am unteren Ende spitz ausgezogene Glasrohre, die mittels einer kleinen Glaskugel und einer darüberliegenden, ca. 0,5 bis 1 cm dicken Schicht Quarzsand verschlossen wurden. Um konstanten Durchfluß während der Chromatographie zu erreichen, verwendeten wir stets eine Schlauchpumpe zur Regelung der Durchflußgeschwindigkeit. Nach der Chromatographie wurden geeignete Anteile jeder zweiten Fraktion auf Radioaktivität getestet, die Gipfelfraktionen vereinigt, einrotiert (Zusatz eines Tropfens n-Octanol zur Vermeidung von Schaumbildung) und in der gewünschten Weise weiterverarbeitet.

7.4.2.2 Gelfiltration an Sephadex G-50

Vorbereitung des Gels und Durchführung der Chromatographie nach Vorschrift des Herstellers (240). Säulenabmessungen vgl. Legenden zu den Abbildungen. Die Fraktionsgröße wurde so gewählt, daß das Säulengesamtvolumen in 200 bis 240 Fraktionen eluiert wurde; in einigen Fällen wurden die Anfangsfraktionen (in denen kein Material enthalten sein konnte) vergrößert und die Elution nach V_0 mit kleineren Fraktionsvolumina fortgesetzt. Probevolumen: 1-2% des Säulengesamtvolumens.

7.4.2.3 Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sephadex

Vorbereitung des Austauschers DEAE-Sephadex A-25 und Durchführung der Chromatographie nach Vorschrift des Herstellers (125). Säulenabmessungen vgl. Legende zu Abb.22. Fraktionsvolumen: im allgemeinen ca. 1/150 des Säulengesamtvolumens. Probenvolumen: bei Proben,

die unter den Startbedingungen vollständig von der Säule festgehalten wurden (T_A) bis 100% des Säulenvolumens; bei Proben, die mit dem Startpuffer von der Säule eluiert wurden (T_B) oder deren Verhalten unbekannt war, 1-2% des Säulengesamtvolumens. Zur Herstellung linearer Gradienten wurden zwei gleich große und gleich geformte offene Mischgefäße verwendet, die mit den gleichen Volumina der Puffer I und II gefüllt und in gleicher Höhe nebeneinander aufgestellt wurden.

Regeneration des DEAE-Sephadex: nach jedem Gebrauch wurde das Gel aus der Säule entnommen und auf einer Nutsche nacheinander in dieser Reihenfolge mit folgenden Lösungen gewaschen:
0,5 N NaOH - H_2O - 0,5 N CH_3COOH - H_2O - Startpuffer.
Die Waschprozeduren wurden jeweils so lange fortgesetzt, bis der pH-Wert der abgesaugten Lösung mit dem der zugegebenen übereinstimmte.

7.4.3 Behandlung von T_A mit DTT

Bedingungen nach (241): 350 000 cpm T_A (ca. 7 nMol); 6 M Guanidin-HCl; 0,5 M Tris-HCl, pH 8,1; 5 mM Ca^{++} ; 7 mM EDTA; 6,5 mM DTT. Gesamtvolumen 1 ml. Inkubationsdauer 4 h bei 50°C. Anschließend Zusatz von 1 ml Eisessig und G-50-Chromatographie; in den T_B zuzuordnenden Fraktionen wurde keine Radioaktivität gefunden.

7.4.4 Chymotrypsin-Verdauung

Ansatz: 160 000 cpm T_A (ca. 3 nMol); 0,02 mg Chymotrypsin (entspricht ca. 1,5% der üblicherweise bei tryptischer Verdauung eingesetzten Trypsin-Menge); 5 ml 0,25 M Tris-HCl, pH 8,1, 2,5 mM Ca^{++} . Inkubation: 20 h bei 30°C. Anschließend Gelfiltration über Sephadex G-50; alles radioaktive Material wurde an der Stelle von T_A eluiert.

7.4.5 Hochspannungs-Papierelektrophorese in MICHL-Tanks

Die Elektrophoresen wurden in Hochspannungs-Elektrophorese-Kammern bei 3350 V durchgeführt. Die Tanks enthielten Varsol als Kühl-

flüssigkeit und folgende Pufferlösungen:

Tank 1: Pyridin:Essigsäure:Wasser = 1:10:189 (v/v); pH 3,5

Tank 2: Pyridin:Essigsäure:Wasser = 100:3:879 (v/v); pH 6,5.

Verwendet wurde stets Whatman No.3 MM-Papier, Länge 112 cm (Spannungsgefälle 30 V/cm); Breite je nach Anzahl und Menge der Proben 20 bis 46 cm. Die Substanzen wurden wie bei der Papierchromatographie punkt- oder strichförmig aufgetragen; die Startlinie befand sich in der Mitte des Papiers (pH 6,5) bzw. 20 cm von der Anode entfernt (pH 3,5). Anschließend wurde das Papier in den Halterahmen eingespannt und mit dem Elektrodenpuffer besprüht; die Startzone wurde hierbei als schmaler Streifen freigelassen, so daß durch das Zusammenfließen des Puffers die Startzone verschärft wurde. Dauer der Elektrophorese 210 min; die anschließende Trocknung erfolgte bei 40-70°C.

Lokalisierung der Substanzen vgl. Kap.7.3.2. Zu eluierende Zonen wurden mit Bleistift eingezeichnet, ausgeschnitten und mit 20% Essigsäure eluiert; wenn eine Substanzprobe in mehreren Anteilen zur Elektrophorese gebracht worden war, wurden die Streifen ggf. zusammengenäht und gemeinsam eluiert.

Verwendung von Marker-Farbstoffen nach (127).

7.4.6 ^{14}C -Acetyl-Beladung der Synthetase und Untersuchung tryptischer ^{14}C -Acetyl-Peptide

7.4.6.1 Beladung

Synthetase (66 mg/ml) wurde in 0,1 M K-PO_4 , pH 6,5, für 5 min bei 0°C mit 0,53 mM ^{14}C -AcetylCoA (1,5·10¹² cpm/Mol) inkubiert. Anschließend wurde die Mischung in 10,8 ml 0,3 M TCE eingerührt, das ausgefällte Protein abzentrifugiert (20 min bei 31000 g), dreimal mit 0,3 M TCE und einmal mit Wasser gewaschen; die letzte Waschflüssigkeit enthielt keine Radioaktivität mehr.

7.4.6.2 Trypsin-Spaltung der ^{14}C -Acetyl-Synthetase

Wegen der Alkali-Empfindlichkeit der Thioester-Bindung mußte die Trypsinspaltung im neutralen Bereich durchgeführt werden. Ansatz: ^{14}C -Acetyl-Synthetase (140 mg, aus obigem Beladungsansatz); 21,5 mg DCC-Trypsin; 15 ml 0,25 M K-PO_4 , pH 6,92. Inkubation für 22 h

bei 25°C unter Rühren.

7.4.6.3 Säulenchromatographische Reinigung von Acetyl-T_B

Die Spaltungsmischung wurde zunächst an Sephadex G-50 (in 50% Essigsäure; Säule 1,65 x 76 cm; Bedingungen wie 7.4.2.2), anschließend der in den T_B zuzuordnenden Fraktionen eluierte Anteil an DEAE-Sephadex chromatographiert (Säule 1,26 x 42 cm; Puffer I: 0,05 M Pyridin-Formiat, pH 6,5; Bedingungen sonst wie 7.4.2.3). Bei der G-50-Chromatographie befanden sich 61% der eluierten Radioaktivität in den T_B-Fraktionen; bei der DEAE-Sephadex-Chromatographie wurden zwei mit dem Startpuffer eluierte Radioaktivitätsgipfel erhalten, von denen der eine (Ac-T_BD₁) 28%, der andere (Ac-T_BD₂) 64% der eingesetzten Radioaktivität enthielt. Die in Ac-T_BD₁ gefundene Radioaktivität war zu 88%, die in Ac-T_BD₂ enthaltene zu 54% gegen PAS stabil.

7.4.6.4 Hochspannungs-Papierelektrophorese von Ac-T_BD₂

Das den Acetylrest teilweise als Thioester enthaltende Acetyl-Peptid Ac-T_BD₂ wurde weiter durch Hochspannungs-Papierelektrophorese gereinigt (WIELAND-PFLEIDERER-Apparatur, Bedingungen wie Kap.7.3.7; pH 3,5). Wir erhielten zwei radioaktive Gipfel Ac-T_BD₂A und Ac-T_BD₂B; Peptid B zeigte identische Wanderung mit CAM-T_B, die darin enthaltene Radioaktivität wurde durch PAS freigesetzt.

7.4.6.5 Papierchromatographie von Ac-T_BD₂B

Durchführung nach Kap.7.3.2; Papier Whatman No.3 MM, Laufmittel F. Eingesetzt wurden ca. 10 000 cpm Ac-T_BD₂B. Nach Durchführung der Chromatographie wurde der Papierstreifen in Stücke von 1 cm Länge zerschnitten und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt (vgl. Abb.20, Kap.4.3). Das Peptidgemisch teilte sich in zwei radioaktive Gipfel Ac-T₁ und Ac-T₂ auf, von denen T₂ identische Wanderung wie CAM-T_B zeigte. Die in T₂ enthaltene Radioaktivität wurde durch PAS-Behandlung freigesetzt.

PAS-Oxydation von Substanzen auf Papierstreifen: nach (242).

7.4.7 Präparative Reinigung von T_B

7.4.7.1 ^{14}C -CAM-Beladung

Ansatz: 1,5 g Fettsäuresynthetase (1465 mE/mg); 0,1 M $K-PO_4$, pH 6,5; 0,2 mM DTT; 0,82 mM $[1-^{14}C]$ IAM (9,8 mCi/mMol). Inkubation 4 h bei $0^\circ C$; Synthetase-Restaktivität nach dieser Zeit: 0,13 %. Überschüssiges IAM wurde sodann durch Sephadex G-25-Filtration (0,1 M $K-PO_4$, pH 6,5; $4^\circ C$; Säule 1,6 x 48 cm) entfernt. Die spezifische Beladung der Synthetase mit ^{14}C -CAM-Resten betrug 3,25.

7.4.7.2 Tryptische Spaltung

Die TCE-denaturierte Synthetase wurde in 400 ml Collidin-Acetat (0,05 M, pH 7,8) bei $4^\circ C$ für 20 h mit 113 mg TPCK-Trypsin behandelt. Nach dieser Zeit wurde noch ungelöstes Material abzentrifugiert; 98% der Radioaktivität befanden sich im Überstand. Auf Nachverdauung des Rückstandes wurde verzichtet.

7.4.7.3 Säulenchromatographie von T_A

Der radioaktivitätshaltige Überstand wurde auf eine mit dem Verdauungspuffer äquilibrierte Säule (DEAE-Sephadex A-25; 3,6 x 105 cm) aufgetragen. Fraktionsvolumen 5,63 ml; Elutionspuffer wie Abb.22. Eluiert wurden mit dem Startpuffer $1,33 \cdot 10^7$ dpm (29% der aufgetragenen Radioaktivität), mit Puffer II $2,88 \cdot 10^7$ dpm (63% der Radioaktivität), entsprechend $1,3 \mu\text{Mol } T_A$.

Die vereinigten T_A -Fraktionen wurden einrotiert, in 50% Essigsäure gelöst und über Sephadex G-50 filtriert (Säule 4,65 x 73 cm; Fraktionsvolumen: Fr. 1-20 10,3 ml; Fr. 21-200 5,15 ml). Die gesamte Radioaktivität wurde an der Stelle von T_A eluiert. Ausbeute $1,72 \cdot 10^7$ dpm (791 nMol T_A -Peptid).

7.4.7.4 Tryptische Nachspaltung von T_A

Die vereinigten T_A -Fraktionen wurden nach Einrotieren in 100 ml 0,25 M Tris-HCl, pH 8,1, 2,5 mM Ca^{++} gelöst und nach Zusatz von 120 mg TPCK-Trypsin für 20 h bei $30^\circ C$ gehalten. Sodann erfolgte Zusatz von Eisessig (bis pH 3), Einrotieren und Aufnehmen in 15 ml 50% Essigsäure.

7.4.7.5 Säulenchromatographie von T_B

Die durch Nachspaltung erhaltene Mischung wurde erneut über die gleiche Sephadex G-50-Säule chromatographiert (wie Kap.7.4.7.3). In den T_B -Fraktionen befanden sich $1,3 \cdot 10^7$ dpm (600 nMol T_B).

Dieses Peptid wurde anschließend der Chromatographie an DEAE-Sephadex unterworfen (Säule $3,6 \times 108$ cm). Mit dem Startpuffer (0,05 M Collidin-Acetat pH 7,8) eluiert wurden $1,07 \cdot 10^7$ dpm (486 nMol T_B).

Die weitere Reinigung erfolgte durch Hochspannungs-Papierelektrophorese (Kap.7.3.7) und Papierchromatographie (Kap.7.3.2). Hierbei traten neben T_B keine weiteren radioaktiven Gipfel auf.

7.4.8 Endgruppenbestimmung mit Dansylchlorid

Die Bestimmung der Amino-Endgruppe wurde, mit den in (121) beschriebenen geringen Modifikationen, nach (224) durchgeführt. Verwendet wurden kleine Zentrifugengläser (70 x 8 mm).

Zur Dünnschichtchromatographie der Dansyl-Aminosäuren verwendeten wir die Laufmittel Dansyl 1,2 und ggf.3 (vgl. Kap.7.1.4) und doppelseitig beschichtete Polyamidfolien ($7,5 \times 7,5$ cm); als Referenzmischung wurden 0,2 μ l einer Lösung von Dansyl-Pro, -Ile, -Phe, -Gly, -Glu, -Ser und -Arg (je 0,1 mg/ml) in 10%iger Ameisensäure aufgetragen. Empfindlichkeit: ca. 0,1 bis 0,2 nMol Dansyl-Aminosäure waren unter der UV-Lampe (350 nm) gut erkennbar.

7.4.9 Sequenzanalyse

Zum Abbau des Peptids T_B nach der EDMAN-Methode verwendeten wir in allen Einzelheiten das von SCHRECKENBACH (120) beschriebene Verfahren, das eine Kombination der in (121), (137) und (140) beschriebenen Arbeitsweisen darstellt. Das Peptid verbleibt hierbei während des gesamten Abbaucyclus in demselben Glas (spitzes Schliffzentrifugenglas, $1,5 \times 10$ cm). Versuche mit dem in (140) angegebenen Dimethylallylamin-Trifluoressigsäure-Puffer anstelle von Pyridin-Wasser verliefen weniger zufriedenstellend.

Die Umlagerung der mit Äther extrahierten Thiazolinone zu den

PTH-Aminosäuren geschah nach EDMAN (137): der Äther wurde mit N_2 verblasen; zum Rückstand wurden 0,2 ml 1 N HCl zugegeben, das Glas mit N_2 gespült, verschlossen und exakt 10 min auf $80^\circ C$ erhitzt. Nach Abkühlen unter Leitungswasser wurde die Mischung dreimal mit je 0,5 ml Essigsäureäthylester extrahiert, anschließend der Essigester mit Stickstoff verblasen und die verbleibende PTH-Aminosäure in Dichloräthan gelöst. Nicht mit Essigester extrahierbare PTH-Aminosäuren (PTH-His, -Arg, -Cysteinsäure) waren in T_B nicht vorhanden. Als Nebenprodukt des EDMAN-Abbaus trat beim beschriebenen Vorgehen lediglich Diphenylthioharnstoff (DPTU) auf; weitere, gelegentlich gefundene Nebenprodukte unterdrückten zwar die Fluoreszenz des in der Dünnschicht enthaltenen Indikators, ergaben aber keine positive Reaktion mit dem Calcein/ $PdCl_2$ -Reagens.

7.4.10 Identifizierung von PTH-Aminosäuren

Wir identifizierten die PTH-Aminosäuren durch Dünnschichtchromatographie. Schicht: Kieselgel 60 F₂₅₄-Alufolie; Laufmittel I oder Laufmittel V bzw. V + IV (Kap. 7.1.4).

Zusammensetzung der Referenzmischungen: Mischung A: PTH-Asn, -Ser, -SCMG, -Gly, -Ala, -Val (je $0,3 \mu\text{Mol/ml}$), PTH-Pro ($1,5 \mu\text{Mol/ml}$); Mischung B: PTH-Gln, -Thr, -Tyr, -Lys, -Met, -Leu (je $0,3 \mu\text{Mol/ml}$); Mischung C: PTH-SCAMG, -Asp, -Glu, -Trp, -Phe, -Ile (je $0,3 \mu\text{Mol/ml}$), Lösungsmittel: Dichloräthan. Aufgetragen zur Chromatographie wurden jeweils $2 \mu\text{l}$ der drei Vergleichsmischungen und Probelösung entsprechend ca. 1 nMol PTH-Aminosäure.

Im Laufmittel I konnten alle PTH-Aminosäuren getrennt werden mit Ausnahme von Asn/Gln, SCMG/Thr, Val/DPTU und in einigen Fällen Gly/Lys. Unklarheiten konnten gelöst werden durch erneute Chromatographie im Laufmittel V bzw. V + IV; für unpolare Aminosäurereste findet gute Trennung im Laufmittel V statt, während polare Reste durch einen zweiten Lauf in der gleichen Richtung im System IV aufgetrennt werden (145). Ob dies erforderlich war, ergab die stets zuerst durchgeführte Chromatographie im System I.

Eine eindeutige Identifizierung von PTH-Val war auch hierdurch nicht möglich; Valin konnte jedoch zweifelsfrei nach reduktiver Spaltung der PTH-Aminosäure in freier Form erkannt werden (Kap. 7.4.11).

Lokalisierung der PTH-Aminosäuren auf den Chromatogrammen:

1. Betrachtung unter UV-Licht (350 nm); PTH-Aminosäuren lösen die Fluoreszenz des der Schicht beigemischten Indikators. Empfindlichkeit ca. 1-5 nMol; Spezifität vergleichsweise gering.
2. Anschließend Besprühen mit Calcein-PdCl₂-Spray (142,243); dieses Reagens ist sehr spezifisch für Schwefelverbindungen, die das Calcein als Komplexliganden vom Pd⁺⁺ verdrängen. Die im Pd-Calcein-Komplex gequenchte Calcein-Fluoreszenz tritt hierbei wieder auf und ermöglicht einen äußerst empfindlichen Nachweis der Schwefelverbindung (Empfindlichkeit: weniger als 0,3 nMol PTH-Aminosäure).

Herstellung des Calcein-PdCl₂-Sprühreagens:

Lösung I: 1 mM Calcein in 0,1 M NaOH; Lösung II: 5 mM PdCl₂ in 0,1 M HCl. 8 ml I und 2 ml II mischen, 0,04 M K-PO₄ zugeben ad pH 7,2, mit H₂O auf 50 ml auffüllen. Über Nacht im Kühlschrank stehen lassen, dann mit gleichem Volumen Aceton verdünnen.

7.4.11 Reduktive Hydrolyse der PTH-Aminosäuren (120, 146)

Der nicht zur Chromatographie verwendete Anteil der PTH-Aminosäuren wurde in ein Zentrifugenglas überführt, getrocknet, mit 200 µl HJ versetzt, evakuiert und zugeschmolzen (vgl. Proteinhydrolyse, Kap.7.3.1). Reaktionsbedingungen: 20 h bei 130°C. Nach der Hydrolyse wurde die Probe getrocknet (Vakuumexsiccator über NaOH, mehrere Tage), mit Dansylchlorid umgesetzt (224) und dünnschichtchromatographisch identifiziert (Kap.7.4.8).

7.4.12 Behandlung von T_B mit Pyrrolidonyl-Peptidase

Ansatz: 25 nMol T_B; 2 ml 0,1 M K-PO₄, pH 7,5, 1 mM K-EDTA, 5 mM DTT, 5% Glycerin; 80 µl Pyrrolidonyl-Peptidase (0,4 mg). Inkubationsdauer 22 h bei 30°C; anschließend Papierchromatographie im Laufmittel F. Der Radioaktivitätsspeak verhielt sich etwas unterschiedlich zu nicht-behandeltem T_B. Nach Elution vom Papier wurde das Peptid dem EDMAN-Abbau unterzogen (Kap.7.4.9); über drei Abbaustufen konnte keine Aminosäure identifiziert werden.

7.5 Versuchsbeschreibungen zu Kap.5

7.5.1 Beladung der Mutanten-Enzyme mit ^{14}C -CAM-Resten und tryptische Spaltung

Beladungsansatz: je ca. 20 mg Synthetase aus folgenden Hefe-Mutanten: Wildtyp-9, fas 1-160, fas 1-169, fas 1-266, fas 2-349 (Züchtung der Hefemutanten und Anreicherung der Fettsäuresynthetase-Präparationen erfolgten im Arbeitskreis von Prof.Dr.E.SCHWEIZER, vgl. (166)); 0,1 M K-PO_4 , pH 6,5; 1 mM $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{IAM}$ (18,4 mCi/mMol); 0°C, 120 min. Nach dieser Zeit wurde das Enzym über Sephadex G-25 filtriert (Säule: Pasteurpipette, 0,5 x 6 cm). Die enzymhaltigen Fraktionen, deren Elutionsposition vorher durch Eichung der Säule mit Bäckerhefe-Synthetase ermittelt worden war, wurden vereinigt und die Abtrennung des ^{14}C -IAM durch Sucrose-Gradientenzentrifugation überprüft. Bedingungen der SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese vgl. (166).

Spaltungsansatz: Aus Anteilen der ^{14}C -CAM-Synthetase-Präparationen wurde das Protein mit 0,3 M TCE ausgefällt, abzentrifugiert und mit je 1,5 mg TPCK-Trypsin in 3 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,1, 1 mM Ca^{++} , für 22 h bei Zimmertemperatur verdaut. Bedingungen der anschließenden Sephadex G-50-Chromatographie vgl. Legende zu Abb.29, S.75.

7.5.2 Test auf "Half-site-Reaktivität" der Synthetase

Beladung: Synthetase (1307 mE/mg; 103 mg/ml); 5 mM DTT; 10 mM IAM; 0,1 M K-PO_4 , pH 6,5. Gesamtvolumen 3,3 ml. Inkubation: 60 min bei 0°C; Restaktivität 0,4%.

Sephadex G-25-Chromatographie: Säule 1,3 x 7 cm; 0,1 M K-PO_4 , pH 6,5; 4°C. Volumen der synthetase-haltigen vereinigten Fraktionen 7,4 ml.

Denaturierung und radioaktive Beladung: 1 mM DTT; 4 M Harnstoff; 6 mM $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{IAM}$; 0,1 M K-PO_4 , pH 6,5. Inkubation unter Rühren für 16 h bei Zimmertemperatur, dann Verdünnen auf dreifaches Volumen und Zugabe von TCE (Endkonzentration 0,3 M). Das ausgefällte Protein wurde abzentrifugiert und fünfmal mit 0,3 M TCE gewaschen. Spezifische Beladung: 25,5 CAM-Reste/Synthetase-Molekül.

Trypsinspaltung: CAM-Synthetase und 40 mg TPCk-Trypsin in 200 ml 0,05 M Collidin-Acetat, pH 7,8; 24 h, 4°C.

DEAE-Sephadex-Chromatographie: Säule 2,92 x 60 cm; Fraktionsvolumen 2,86 ml. Elution: 150 Fraktionen mit 0,05 M Collidin-Acetat, pH 7,8; dann 190 Fraktionen mit 0,75 M Pyridin-Acetat, pH 6,0. Gesamt-Radioaktivitätsausbeute der Chromatographie: 85%.

Sephadex G-50-Chromatographie: Säule 4,65 x 73 cm; 50% Essigsäure. Fraktionsvolumen 5,35 ml. Gesamt-Radioaktivitätsausbeute 65%.

Trypsin-Nachspaltung: 980 000 dpm T_A' ; 40 mg TPCk-Trypsin; 40 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,1, 1 mM Ca^{++} ; 20 h, 30°C.

Zweite Sephadex G-50-Chromatographie: Bedingungen wie oben. Gesamt-Radioaktivitätsausbeute der Nachspaltung und Chromatographie 60%, davon 60% in T_B' -Fraktionen.

Zweite DEAE-Sephadex-Chromatographie: Säule 2,92 x 63,3 cm; Fraktionsvolumen 2,83 ml. Gesamt-Radioaktivitätsausbeute 64%.

Hochspannungs-Papierelektrophorese: Bedingungen vgl. Kap.7.4.5; pH 3,5. Der radioaktive Hauptgipfel zeigte identische Wanderung mit CAM- T_B . Elution ergab 26 500 dpm.

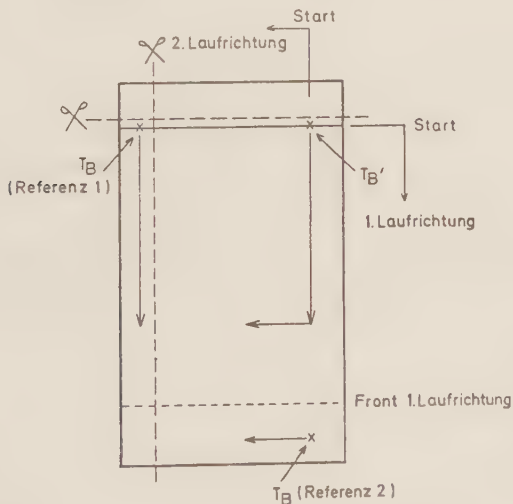


Abb.49 Schema der Papiereinteilung für die zweidimensionale Papierchromatographie von T_B'

Entlang der mit dem Scherensymbol $\times$ bezeichneten Linien wurde der Bogen nach Lauf in der ersten Richtung abgeschnitten.

Papierchromatographie: eingesetzt wurden 5300 dpm; Whatman 1-Papier; 1.Dimension: Laufmittel F, 2.Dimension: Laufmittel A. Am Rande des Papiers lief jeweils T_B als Vergleich mit; die Referenz für die zweite Laufrichtung wurde erst nach dem ersten Lauf aufgetragen. Papiereinteilung vgl. Abb.49.

7.6 Versuchsbeschreibungen zu Kap.6

7.6.1 MalonylCoA-Decarboxylase-Test (Methode a)

Eine Küvette ($d = 1$ cm) enthält im Gesamtvolumen 1 ml:
100 μ Mol Tris-HCl, pH 8,1; 20 μ Mol Cystein; 25 μ Mol Kalium-D,L-malat; 1,5 μ Mol NAD^+ ; 0,4 mg Serumalbumin; 2 E Malat-Dehydrogenase; 0,8 E Citrat-Synthase sowie MalonylCoA-Decarboxylase. Start des Tests durch Zugabe von 0,3 μ Mol MalonylCoA. Meßgröße ist die Extinktionszunahme bei 334 nm. 1 Enzymeinheit (E) ist diejenige Enzymmenge, die pro Minute 1 μ Mol MalonylCoA verbraucht (bzw. 1 μ Mol AcetylCoA erzeugt); dies hat unter den Versuchsbedingungen die Entstehung von 1 μ Mol NADH zur Folge.

7.6.2 MalonylCoA-Decarboxylase-Test (Methode b)

Eine Küvette ($d=1$ cm) enthält im Gesamtvolumen 1 ml:
100 μ Mol K_2PO_4 , pH 6,5; 20 μ Mol Cystein; 0,4 mg Serumalbumin; 80 nMol NADPH; 40 nMol NADH; Fettsäuresynthetase (Menge vgl. Legendenden zu Abb.38 a und b) sowie MalonylCoA-Decarboxylase. Gestartet wird durch Zugabe von 120 nMol MalonylCoA oder 600 nMol S-Malonyl-N-capryloyl-cysteamin. Meßgröße: Extinktionsabnahme bei 334 nm. Berechnung der Decarboxylase-Aktivität wie Synthetase-Standardtest (Kap.7.1.5), das Ergebnis muß durch 7,7 dividiert werden (vgl. Kap.6.2).



Zusammenfassung

Die Reaktion der Fettsäuresynthetase aus Hefe mit dem SH-Reagens Jodacetamid wurde untersucht. Das Enzym wird durch IAM in einer bimolekularen Reaktion inaktiviert; die Inhibierung erfolgt synchron zum Einbau von Carboxamidomethyl-Resten in das Protein und kann durch Acetylbeladung der Synthetase verhindert werden. Unter geeigneten Bedingungen werden selektiv nur drei identische Cysteinreste des Proteins alkyliert; diese Spezifität konnte auf das Vorliegen einer "prädissoziierten" SH-Gruppe zurückgeführt werden. - Die Enzymaktivität wird auch durch andere SH-Reagentien beseitigt.

Beladung der Synthetase mit ^{14}C -IAM und anschließende Proteinhydrolyse mit Salzsäure liefert als einziges radioaktives Produkt ^{14}C -SCMC; dieses geht in Anwesenheit von HCl bei Behandlung mit Perameisensäure nicht nur in SCMC-Sulfon, sondern auch in das Ringschlußprodukt SCMC-Lactam-sulfon über. Die Bildungsbedingungen für das Lactam-sulfon wurden studiert. - Das offenkettige SCMC-Sulfon andererseits ist unter den Bedingungen der Proteinhydrolyse instabil.

Enzymatische Spaltung von ^{14}C -CAM-Synthetase mit Trypsin und Untersuchung der Spaltpeptide ergab, daß die drei CAM-Bindungsstellen sich in identischen Abschnitten der Primärstruktur befinden. Das zunächst entstehende Spaltpeptid T_A geht bei längerer Inkubation mit höherer Trypsin-Konzentration in ein kleineres CAM-Peptid T_B über, das kein Lysin oder Arginin enthält. Dieses Peptid konnte durch Säulenchromatographie, Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie gereinigt und teilweise sequenziert werden.

Nach Beladung der Synthetase mit ^{14}C -AcetylCoA und Trypsinspaltung gelang es, ein Acetylpeptid zu erhalten, das identisches Verhalten mit dem CAM-Peptid T_B zeigte. In Verbindung mit anderen Ergebnissen konnte hierdurch bewiesen werden, daß die CAM-Bindungsstelle mit der Acetyl-Bindungsstelle an der kondensierenden Enzymkomponente, d.h. der peripheren SH-Gruppe, identisch ist.

Markierung der peripheren SH-Gruppen mit ^{14}C -IAM ermöglichte den Nachweis, daß die kondensierende Teilaktivität der Synthetase auf der größeren der beiden Untereinheiten des Multienzymkomplexes lokalisiert ist und sich demnach auf der gleichen Polypeptidkette befindet wie das ACP der Synthetase. Die auf der Basis genetischer Untersuchungen vorgeschlagene Zuordnung der Teilaktivitäten auf die beiden Polypeptidketten konnte somit für das kondensierende Teilenzym auf protein-chemischem Wege bestätigt werden.

Fettsäuresynthetase wird gegenwärtig als Hexameres (A_6B_6) angesehen. Gegen IAM zeigt das Enzym demnach Half-site-Reaktivität. Es konnte gezeigt werden, daß nach Alkylierung der drei im nativen Enzym für IAM zugänglichen peripheren SH-Gruppen noch weitere, in identischer Umgebung befindliche SH-Gruppen im Komplex vorhanden sind, die erst nach Denaturierung des Enzyms vom IAM angegriffen werden.

Behandlung der Synthetase mit IAM verleiht dem Enzym die neue enzymatische Aktivität einer Malonyl-CoA-Decarboxylase. Untersuchung der Kinetik der Decarboxylase-Bildung ergab, daß diese Aktivität synchron zum Verschwinden der Fettsäuresynthetase-Aktivität entsteht. Ein Mechanismus wurde vorgeschlagen, der das Auftreten der MalonylCoA-Decarboxylase-Aktivität als Folge der Carbox-amidomethylierung von peripheren SH-Gruppen zu erklären versucht.

- 1 SCHWARTZ, A. & OSCHMANN, A. (1925) *Compt. Rend. Soc. Biol.* 92, 169;
zit. nach: FLORKIN, M. (1975) in: *Comprehensive Biochemistry*
(FLORKIN, M. & STOTZ, E.H., eds.), Vol. 31, S. 183, Elsevier
Scientific Publ. Comp. Amsterdam
- 2 LUNDGAARD, E. (1930) *Biochem. Z.* 217, 162-177
- 3 LUNDGAARD, E. (1930) *Biochem. Z.* 220, 8-18
- 4 LUNDGAARD, E. (1930) *Biochem. Z.* 227, 51-83
- 5 WEBB, J.L. (1966) *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol. 2,
S. 635-653, Academic Press New York
- 6 COLOWICK, S.P., LAZAROW, A., RACKER, E., SCHWARZ, D.R., STADTMAN,
E.R. & WAELSCH, H. (eds.) (1954) *Glutathione*, Academic Press
New York
- 7 GUZMAN BARRON, E.S. (1951) *Adv. Enzymol.* 11, 201-266
- 8 BOYER, P.D. (1959) in: *The Enzymes* (BOYER, P.D., LARDY, H. &
MYRBÄCK, K., eds.), 2nd edition, Vol. 1, S. 511-588, Academic
Press New York
- 9 BOYER, P.D. & SCHULZ, A.R. (1959) in: *Sulfur in Proteins*
(BENESCH, R., BENESCH, R.E., BOYER, P.D., KLOTZ, I.M., MIDDLE-
BROCK, W.R., SZENT-GYÖRGYI, A.R. & SCHWARZ, D.R. eds.), S. 199-
213, Academic Press New York
- 10 CECIL, R. & MCPHEE, J.R. (1959) *Adv. Prot. Chem.* 14, 255-389
- 11 CECIL, R. (1963) in: *The Proteins* (NEURATH, H. ed.), 2nd edition,
Vol. 1, S. 379-476, Academic Press New York
- 12 LYNN, F. (1970) in: *Chemical Reactivity and Biological Role*
of Functional Groups in Enzymes (SMELLIE, R.M.S. ed.), S. 1-19,
Academic Press London
- 13 JOCELYN, P. (1972) *Biochemistry of the SH Group*, Academic
Press London
- 14 FLUHARTY, A.L. (1974) in: *The chemistry of the thiol group*
(PATAI, S. ed.), S. 589-668, John Wiley & Sons London
- 15 FRAENKEL-CONRAT, H. (1956) *Ann. Rev. Biochem.* 25, 291-330
- 16 THEORELL, H. (1938) *Biochem. Z.* 298, 242-267
- 17 WALKER, W.H., KEARNEY, E.B., SENG, R.L. & SINGER, T.P. (1971)
Eur. J. Biochem. 24, 328-331
- 18 LOVENBERG, W. (ed.) (1973) *Iron-Sulfur Proteins*, Academic Press
New York
- 19 LYNN, F., REICHERT, E. & RUEFF, L. (1951) *Ann.* 574, 1-32
- 20 LIPMANN, F. (1941) *Adv. Enzymol.* 1, 99-132
- 21 JAENICKE, L. & LYNN, F. (1960) in: *The Enzymes* (BOYER, P.D.,
LARDY, H. & MYRBÄCK, K. eds.), 2nd edition, Vol. 3, S. 3-104,
Academic Press New York
- 22 SMITH, E.L. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 1392-1397

- 23 KRIMSKY, I. & RACKER, E. (1955) *Science* 122, 319-321
- 24 REED, L.J. (1960) in: *The Enzymes* (BOYER, P.D., LARDY, H. & MYRBACK, K. eds.), 2nd edition, Vol.3, S.195-223, Academic Press New York
- 25 BUCKEL, W., BUSCHMEIER, V. & EGGERER, H. (1971) *Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.* 352, 1195-1205
- 26 LIPMANN, F., GEVERS, W., KLEINKAUF, H. & ROSKOSKI jr., R. (1971) *Adv.Enzymol.* 35, 1-34
- 27 FRØYSHOV, Ø. (1975) *Eur.J.Biochem.* 59, 201-206
- 28 GEHRING, U. & LYNEN, F. (1972) in: *The Enzymes* (BOYER, P.D. ed.), 3rd edition, Vol.7, S.391-405, Academic Press New York
- 29 LYNEN, F. (1970) in: *Miami Winter Symposia*, Vol.1, S.151-175, North-Holland Publ.Comp. Amsterdam
- 30 WAKIL, S.J. (1970) *Lipid Metabolism*, S.1-48, Academic Press New York
- 31 LYNEN, F. (1972) in: *Current Trends in the Biochemistry of Lipids* (GANGULY, J. & SMELLIE, R.M.S. eds.), S.5-25, Academic Press London
- 32 VOLPE, J.J. & VAGELOS, P.R. (1973) *Ann.Rev.Biochem.* 42, 21-60
- 33 LYNEN, F., HOPFNER-KESSEL, I. & EGGERER, H. (1964) *Biochem.Z.* 340, 95-124
- 34 BRESSLER, R. & WAKIL, S.J. (1962) *J.Biol.Chem.* 237, 1441-1448
- 35 BROOKS, J.L. & STUMPF, P.K. (1966) *Arch.Biochem.Biophys.* 116, 108-116
- 36 LYNEN, F. (1960) *Sitzungsber.d.Bayer.Akad.d.Wiss., Math.-Nat. Klasse*, S.8-10
- 37 LYNEN, F. (1961) *Fed.Proc.* 20, 941-951
- 38 LYNEN, F. (1967) *Biochem.J.* 102, 381-400
- 39 PIRSON, W. (1970) *Diss. Univ.München*
- 40 PIRSON, W. & LYNEN, F. (1971) *Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.* 352, 797-804
- 41 LYNEN, F. (1962) *Proc.R.A.Welch Found.Conf.on Chem.Res. No.5*, Houston, Texas, S.293-328
- 42 PILZ, I., HERBST, M., KRATKY, O., OESTERHEIT, D. & LYNEN, F. (1970) *Eur.J.Biochem.* 13, 55-64
- 43 WEITHMANN, U. (1974) *Diss. Univ.München*
- 44 OESTERHEIT, D., BAUER, H. & LYNEN, F. (1969) *Proc.Natl.Acad.Sci. (US)* 63, 1377-1382
- 45 HOLTERMÜLLER, K.H., RINGELMANN, E. & LYNEN, F. (1970) *Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.* 351, 1411-1422
- 46 ELOVSON, J. (1975) *J.Bact.* 124, 524-533
- 47 HSU, R.-Y., WASSON, G. & PORTER, J.W. (1965) *J.Biol.Chem.* 240, 3736-3746
- 48 BURTON, D.N., HAAVIK, A.G. & PORTER, J.W. (1968) *Arch.Biochem. Biophys.* 126, 141-154

- 49 WILSON, A.C. & WILLIAMSON, I.P. (1970) Biochem.J. 117, 26P-27P
- 50 CAREY, E.M. & DILS, R. (1970) Biochim.Biophys.Acta 210, 371-378
- 51 RONCARI, D.A.K. (1974) Can.J.Biochem. 52, 221-230
- 52 PRESCOTT, D.J. & VAGELOS, P.R. (1972) Adv.Enzymol. 36, 269-311
- 53 STUMPF, P.K. (1969) Ann.Rev.Biochem. 38, 159-212
- 54 LYNEN, F. (1962) in: Redoxfunktionen cytoplasmatischer Strukturen, Gem.Tagung d.Dt.Ges.f.physiol.Chem. und d.Österr. Biochem.Ges. Wien, S.121-143
- 55 LYNEN, F. (1964) in: New Perspectives in Biology (SELA, M. ed.), S.132-146, Elsevier Publ.Comp. Amsterdam
- 56 SUMPER, M., OESTERHEIT, D., RIEPERTINGER, C. & LYNEN, F. (1969) Eur.J.Biochem. 10, 377-387
- 57 MAJERUS, P.W., ALBERT, A.W. & VAGELOS, P.R. (1964) Proc.Natl. Acad.Sci. (US) 51, 1231-1238
- 58 ARNSTADT, K.-I. (1973) Diss. Univ. München
- 59 ARNSTADT, K.-I., SCHINDLBECK, G. & LYNEN, F. (1975) Eur.J.Biochem. 55, 561-571
- 60 LYNEN, F. (1959) J.Cell.Comp.Physiol. 54, Suppl.1, 33-49
- 61 OESTERHEIT, D. (1967) Diss. Univ. München
- 62 LYNEN, F., OESTERHEIT, D., SCHWEIZER, E., & WILLECKE, K. (1968) in: Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism (GRAN, F.C. ed.), S.1-24, Universitetsforlaget, Oslo
- 63 SCHWEIZER, E., PICCININI, F., DUBA, C., GÜNTHER, S., RITTER, E. & LYNEN, F. (1970) Eur.J.Biochem. 15, 483-499
- 64 VAGELOS, P.R., MAJERUS, P.W., ALBERT, A.W., LARRABEE, A.R. & AILHAUD, G.P. (1966) Fed.Proc. 25, 1485-1494
- 65 SUMPER, M. (1970) Diss. Univ. München
- 66 SCHWEIZER, E., WILLECKE, K., WINNEWISSER, W. & LYNEN, F. (1970) Vitamins and Hormones 28, 329-343
- 67 SCHWEIZER, E. (1963) Diss. Univ. München
- 68 HAGEN, A. (1963) Diss. Univ. München
- 69 GUNDLACH, H.G., MOORE, S. & STEIN, W.H. (1959) J.Biol.Chem. 234, 1761-1764
- 70 CRESTFIELD, A.M., STEIN, W.H. & MOORE, S. (1963) J.Biol.Chem. 238, 2413-2420
- 71 ZIEGENHORN, J. (1970) Diss. Univ. München
- 72 WILLECKE, K. (1968) Diss. Univ. München
- 73 YALPANI, M., WILLECKE, K. & LYNEN, F. (1969) Eur.J.Biochem. 8, 495-502
- 74 LYNEN, F. (1969) Meth.Enz. 14, 17-33
- 75 KUMAR, S., PHILLIPS, G.T. & PORTER, J.W. (1972) Int.J.Biochem. 3, 15-32
- 76 SUMPER, M. & LYNEN, F. (1972) FEBS Letters 28, 142-144
- 77 WEBB, J.L. (1966) Enzyme and Metabolic Inhibitors, Vol.3, S.1-284, Academic Press New York

- 78 SINGER, S.J. (1967) Adv.Prot.Chem. 22, 1-54
- 79 LINDLEY, H. (1960) Biochem.J. 74, 577-584
- 80 WATTS, D.G. & RABIN, B.R. (1962) Biochem.J. 85, 507-516
- 81 HOLLAWAY, M.R., MATHIAS, A.P. & RABIN, B.R. (1964) Biochim. Biophys.Acta 92, 111-124
- 82 CRAMPTON, M.R. (1974) in: The chemistry of the thiol group (PATAI, S. ed.), S.400, John Wiley & Sons London
- 83 COHN, E.J. & EDSALL, J.T. (1943) Proteins, Amino Acids and Peptides, Reinhold Publ.Comp. New York
- 84 NIVARD, R.J.F. & TESSER, G.I. (1965) in: Comparative Biochemistry (FLORKIN, M. & STOTZ, E.H., eds.), Vol.6, S.170, Elsevier Publ.Comp. Amsterdam
- 85 GRAFIUS, M.A. & NEILANDS, J.B. (1955) J.Amer.Chem.Soc. 77, 3389-3390
- 86 JOSHI, V.G., PLATE, C.A. & WAKIL, S.J. (1970) J.Biol.Chem. 245, 2857-2867
- 87 WALLENFELS, K. & EISELE, B. (1970) in: Chemical Reactivity and Biological Role of Functional Groups in Enzymes (SMELLIE, R.M.S. ed.), S.21-35, Academic Press London
- 88 SEMENOW-GARWOOD, D. (1972) J.Org.Chem. 37, 3797-3803
- 89 LUST, G., unveröffentlichte Versuche
- 90 STRYER, L. (1968) Science 162, 526-533
- 91 EDELMAN, G.M. & McCLURE, W.O. (1968) Acc.Chem.Res. 1, 65-70
- 92 WEBER, G. (1972) Ann.Rev.Biophys.Bioeng. 1, 553-570
- 93 HUDSON, E.N. & WEBER, G. (1973) Biochemistry 12, 4151-4161
- 94 GHOSH, P.B. & WHITEHOUSE, M.W. (1968) Biochem.J. 108, 155-156
- 95 PRICE, N.C. & RADDA, G.K. (1974) Biochim.Biophys.Acta 371, 102-116
- 96 OESTERHEIT, D., persönl. Mitteilung
- 97 SCHWEIZER, E., KNIEP, B., CASTORPH, H. & HOLZNER, U. (1973) Eur.J.Biochem. 39, 353-362
- 98 SCHÖBERL, A. & WAGNER, A. (1955) in: HOUBEN-WEYL, Methoden der organ.Chemie (MÜLLER, E. ed.), Bd.9, S. 207-222; 223-262, Georg Thieme-Verlag Stuttgart
- 99 MOORE, S. & STEIN, W.H. (1963) Meth.Enz. 6, 819-831
- 100 HARRIS, I., MERIWETHER, B.P. & HARTING PARK, J. (1963) Nature 198, 154-157
- 101 SMYTHE, C.V. (1936) J.Biol.Chem. 114, 601-612
- 102 GURD, F.R.N. (1972) Meth.Enz. 25, 424-437
- 103 MOORE, S. (1963) J.Biol.Chem. 238, 235-237
- 104 GREENSTEIN, J.P. & WINITZ, M. (1961) Chemistry of the Amino Acids, Vol.3, S.1937
- 105 OZAWA, H. (1963) Bull.Soc.Chem.Japan 36, 920-922
- 106 SMYTH, D.S. & UTSUMI, S. (1967) Nature 216, 332-335
- 107 PRESS, E.M. (1967) Biochem.J. 104, 30C-33C

- 108 BRADBURY, A.F. & SMYTH, D.G. (1973) *Biochem.J.* 131, 637-642
- 109 LIGHT, A. & SMITH, E.L. (1963) in: *The Proteins* (NEURATH, H. ed.), 2nd edition, Vol.1, S.244, Academic Press New York
- 110 SATCHELL, D.P.N. & SATCHELL, R.S. (1969) in: *The chemistry of carboxylic acids and esters* (PATAI, S. ed.), S.375-452 John Wiley & Sons London
- 111 CHIN, C.C.Q. & WOLD, F. (1975) *Arch.Biochem.Biophys.* 167, 448-451
- 112 CLARK, L.W. (1969) in: *The chemistry of carboxylic acids and esters* (PATAI, S. ed.), S.589-622, John Wiley & Sons London
- 113 ERLANGER, B.F. & COHEN, W. (1963) *J.Amer.Chem.Soc.* 85, 348-349
- 114 KOSTA, V. & CARPENTER, F.H. (1964) *J.Biol.Chem.* 239, 1799-1803
- 115 SCHWEIZER, E., persönl. Mitteilung
- 116 GEHRING, U. & HARRIS, J.I. (1968) *FEBS Letters* 1, 150-152
- 117 GEHRING, U. & HARRIS, J.I. (1970) *Eur.J.Biochem.* 16, 492-498
- 118 GEHRING, U., RIEPERTINGER, C. & LYNEN, F. (1968) *Eur.J.Biochem.* 6, 264-280
- 119 AYLING, J., PIRSON, R. & LYNEN, F. (1972) *Biochemistry* 11, 526-532
- 120 SCHRECKENBACH, T. (1975) Diss. Univ. München
- 121 PERHAM, R.N. & HARRIS, I. (1974) *EMBO Course on Protein Sequence Analysis*, Cambridge (Skriptum)
- 122 HARTLEY, B.S. (1970) *Biochem.J.* 119, 805-822
- 123 SCHIELE, U. (1973) Diss. Univ. München
- 124 DESNUELLE, P. (1960) in: *The Enzymes* (BOYER, P., LARDY, H. & MYRBÄCK, K. eds.), 2nd edition, Vol.4, S.119-132, Academic Press New York
- 125 Sephadex-Ionenaustauscher, Firmenschrift der Fa. Pharmacia, Uppsala (1973)
- 126 MICHL, H. (1958) *J.Chromatogr.* 1, 93-121
- 127 High Voltage Electrophoresis Guide, Firmenschrift der Fa. Savant Instruments, Hicksville, USA
- 128 WIELAND, T. & PFLEIDERER, G. (1955) *Ang.Chemie* 67, 257-260
- 129 BURGMAN, L. in Fa. Savant Instruments, persönl.Mitteilung
- 130 UDENFRIEND, S., STEIN, S., BÖHLEN, P., DAIRMAN, W., LEIMGRUBER, W. & WEIGLE, M. (1972) *Science* 178, 871-872
- 131 MAHLER, H.R. & CORDES, E.H. (1966) *Biological Chemistry*, S.10, Harper & Row New York
- 132 GORECKI, M. & SHALITIN, Y. (1967) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 29, 189-193
- 133 INGANAMI, T. & STURTEVANT, J.M. (1960) *J.Biol.Chem.* 235, 1019-1023
- 134 HILL, R.L. (1965) *Adv.Prot.Chem.* 20, 37-107
- 135 ZIEGENHORN, J., NIEDERMEIER, R., NÜSSLER, C. & LYNEN, F. (1972) *Eur.J.Biochem.* 30, 285-300

- 136 PHILLIPS,G.T., NIXON,J.E., ABRAMOVITZ,A.S. & PORTER,J.W.
(1970) Arch.Biochem.Biophys. 138, 357-371
- 137 EDMAN,P. (1970) in: Protein Sequence Determination (NEEDLE-
MAN,S.B. ed.), S.211-255, Springer-Verlag Berlin
- 138 GRAY,W.R. & HARTLEY,B.S. (1963) Biochem.J. 89, 379-380
- 139 EDMAN,P. (1950) Acta Chem.Scand. 4, 283-293
- 140 PETERSON,J.D., NEHRlich,S., OYER,P.E. & STEINER,D.F. (1972)
J.Biol.Chem. 247, 4866-4871
- 141 SUMMERS,M.R., SMYTHERS,G.W. & OROSZIAN,S. (1973) Analyt.
Biochem. 53, 624-628
- 142 FREI,R.W., MacLELLAN,B.L. & MacNEIL,J.D. (1973) Anal.Chim.
Acta 66, 139-142
- 143 INGLIS,A.S. & NICHOLLS,P.W. (1974) J.Chromatogr. 97, 289-292
- 144 INGLIS,A.S. & NICHOLLS,P.W. (1973) J.Chromatogr. 79, 344-346
- 145 JEPSSON,J.-O. & SJÖQUIST,J. (1967) Analyt.Biochem. 18,
264-269
- 146 SMITHIES,O., GIBSON,D., FANNING,E.M., GOODFLIESH,R.M.,
GILMAN,J.G. & BALLANTYNE,D.L. (1971) Biochemistry 10,
4912-4916
- 147 NARITA,K. (1970) in: Protein Sequence Determination (NEEDLE-
MAN,S.B. ed.), S.82-89, Springer-Verlag Berlin
- 148 HALEY,E.E. & CORCORAN,B. (1967) Biochemistry 6, 2668-2672
- 149 SMYTH,D.G. & MOORE,S. (1962) J.Biol.Chem. 237, 1845-1850
- 150 DOOLITTLE,R.F. (1972) Meth.Enz. 25, 231-244
- 151 SCHWEIZER,E., KÜHN,L. & CASTORPH,H. (1971) Hoppe-Seyler's
Z.physiol.Chem. 352, 377-384
- 152 KÜHN,L., CASTORPH,H. & SCHWEIZER,E. (1972) Eur.J.Biochem.
24, 492-497
- 153 BURKL,G., CASTORPH,H. & SCHWEIZER,E. (1972) Molec. gen.
Genet. 119, 315-322
- 154 SCHWEIZER,E., HOLZNER,U., MEYER,K.-H., TAURO,P. & SCHWEIZER,M.
(1974) in: Comparative Biochemistry and Physiology of
Transport (BOLIS,L., BLOCH,K., LURIA,S.E. & LYNEN,F. eds.),
S.219-244, North-Holland Publ.Comp. Amsterdam
- 155 SCHWEIZER,E. (1973) Angew.Chemie 85, 365
- 156 TAURO,P., HOLZNER,U., CASTORPH,H., HILL,F. & SCHWEIZER,E.
(1974) Molec.gen.Genet. 129, 131-148
- 157 SCHWEIZER,E. (1974) Abstr.Comm. 9th FEBS Meeting Budapest,
S.30
- 158 SCHWEIZER,E., DIETLEIN,G., GIMMLER,G., KNOBLING,A., TAHEDL,
H.W., SCHWIFT,H. & SCHWEIZER,M. (1975) in: Proc. 10th FEBS
Meeting Paris, Vol.40 (DESNUELLE,P. & MICHELSON,A.M. eds.),
S.25-34, North-Holland Publ.Comp. Amsterdam
- 159 SUMPER,M., RIEPERTINGER,C. & LYNEN,F. (1969) FEBS Letters
5, 45-49
- 160 BUTTERWORTH,P.H.W., YANG,P.C., BOCK,R.M. & PORTER,J.W.
(1967) J.Biol.Chem. 242, 3508-3516

- 161 SMITH,S. & ABRAHAM,S. (1970) J.Biol.Chem. 245, 3209-3217
- 162 YUN,S. & HSU,R.Y. (1972) J.Biol.Chem. 247, 2689-2698
- 163 LORNITZO,F.A., QURESHI,A.A. & PORTER,J.W. (1975) J.Biol. Chem. 250, 4520-4529
- 164 STOOPS,J.K., ARSLANIAN,M.J., OH,Y.H., AUNE,K.C., VANAMAN, T.C. & WAKIL,S.J. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci. (US) 72, 1940-1944
- 165 HESS,S. und WIELAND,F., unveröffentlichte Versuche
- 166 KRESZE,G.-B., OESTERHEIT,D., LYNEN,F., CASTORPH,H. & SCHWEIZER, E. (1976) Biochem.Biophys.Res.Comm., im Druck
- 167 SCHWEIZER,E., persönl. Mitteilung
- 168 SCHWEIZER,E., CHAN,W., DUBA,C. & LYNEN,F. (1966) in: Lipaide, 16.Coll.d.Ges.f.physiol.Chem. (SCHÜTTE,E. ed.), S.49-63, Springer-Verlag Berlin
- 169 WELLS,W.W., SCHULTZ,J. & LYNEN,F. (1967) Biochem.Z. 346, 474-490
- 170 WINNEWISSER,W. (1969) Diplomarbeit, Univ. München
- 171 DARNAU,D.W. & KLOTZ,I.M. (1975) Arch.Biochem.Biophys. 166, 651-682
- 172 LEVITZKI,A., STALLCUP,W.B. & KOSHLAND JR.,D.E. (1971) Biochemistry 10, 3371-3378
- 173 LAZDUNSKI,M. (1972) in: Current Topics in Cellular Regulation (HORECKER,B.L. & STADTMAN,E.R. eds.), Vol.6, S.267-310, Academic Press New York
- 174 STALLCUP,W.B. & KOSHLAND JR.,D.E. (1973) J.Mol.Biol. 80,41-62
- 175 LAZDUNSKI,M. (1974) Progr.Bioorg.Chem. 3, 81-140
- 176 TSERNOGIU,D., HILL,E. & BANASZAK,L.J. (1971) Cold Spring Harbour Symp.Quant.Biol. 36, 171-177
- 177 BERNHARD,S.A., DUNN,M.F., LUISI,P.L. & SCHACK,P. (1970) Biochemistry 9, 185-192
- 178 BRAND,K., ISOLAS,O. & HORECKER,B.L. (1969) Arch.Biochem. Biophys. 130, 521-529
- 179 STALLCUP,W.B. & KOSHLAND JR.,D.E. (1973) J.Mol.Biol. 80,77-91
- 180 LAZDUNSKI,M., PETITCLERC,C., CHAPPELET,D. & LAZDUNSKI,C. (1971) Eur.J.Biochem. 20, 124-139
- 181 SHAFER,J.A., CHIANCONE,E., YIELDING,K.L. & ANTONINI,E. (1972) Eur.J.Biochem. 28, 528-532
- 182 FERSHT,A.R. (1975) Biochemistry 14, 5-12
- 183 FASIOLO,F. & EBEL,J.P. (1976) Hoppe-Seyler's 4.physiol.Chem. 357, 292
- 184 VINCENT,F., WEINTRAUB,H., ALFSEN,A. & BAULIEU, E.-E. (1976) FEBS Letters 62, 126-131
- 185 KOSHLAND JR.,D.E., NEMETHY,G. & FILMER,D. (1966) Biochemistry 5, 365-385
- 186 LYNEN,F. (1964) in: Biogenesi delle sostanze naturali, VIIo corso estivo di chimica, Milano 1962, S.199-218
- 187 GREENSPAN,M.D., ALBERTS,A.W. & VAGELOS,P.R. (1969) J.Biol. Chem. 244, 6477-6485

- 188 PRESCOTT, D.J. & VAGELOS, P.R. (1970) J.Biol.Chem. 245, 5484-5490
- 189 D'AGNOLO, G., ROSENFELD, I.S., AWAYA, J., OMURA, S. & VAGELOS, P.R. (1973) Biochim.Biophys.Acta 326, 155-166
- 190 D'AGNOLO, G., ROSENFELD, I.S. & VAGELOS, P.R. (1975) J.Biol. Chem. 250, 5283-5288
- 191 HAGEN, A. & HOFSCHEIDER, P.H. (1964) 3rd Eur.Reg.Conf.on Electron Microscopy, S.69-70
- 192 HOPPE, W., GASSMANN, J., HUNSMANN, N., SCHRAMM, H.J. & STURM, M. (1974) Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 355, 1483-1487
- 193 LYNEN, F. (1976) Vortrag auf der Jahrestagung des Ges.f.Biol. Chemie, München
- 194 HESS, S., unveröffentlichte Versuche
- 195 BUEHNER, M., FORD, G.C., MORAS, D., OLSEN, K.W. & ROSSMANN, M.G. (1974) J.Mol.Biol. 90, 25-49
- 196 KLEE, C.B. (1972) J.Biol.Chem. 247, 1398-1406
- 197 REISLER, E., TAUBER-FINKELSTEIN, M. & SHALTIEL, S. (1975) FEBS Letters 54, 315-318
- 198 DECKER, K. (1974) in: Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMAYER, H.U. ed.), 3.Aufl., S.2037-2042, Verlag Chemie Weinheim
- 199 LEE, R.P. & WESTHEIMER, F.H. (1966) Biochemistry 5, 834-837
- 200 SEYDOUX, F., MALHOTRA, O.P. & BERNHARD, S.A. (1974) CRC Crit. Rev.Biochem. 2, 227-257
- 201 HANSEN, H.J.M., CAREY, E.M. & DILS, R. (1971) Biochim.Biophys. Acta 248, 391-405
- 202 LAW, S.W.T. & BURTON, D.N. (1973) Can.J.Biochem. 51, 241-248
- 203 SCHOLTE, H.R. (1973) Biochim.Biophys.Acta 309, 457-465
- 204 KATIYAR, S.S., BRIEDIS, A.V. & PORTER, J.W. (1974) Arch.Biochem. Biophys. 162, 412-420
- 205 TOOMEY, R.E. & WAKIL, S.J. (1966) J.Biol.Chem. 241, 1159-1165
- 206 ALBERTS, A.W., BELL, R.M. & VAGELOS, P.R. (1972) J.Biol.Chem. 247, 3190-3198
- 207 LYNEN, F. (1974) Abstr.Comm. 9th FEBS Meeting Budapest, S.105-131
- 208 BLOW, D.M., BIRKTOFT, J.J. & HARTLEY, B.S. (1969) Nature 221, 337-340
- 209 PODACK, E.R. & SEUBERT, W. (1972) Biochim.Biophys.Acta 280, 235-247
- 210 GOLDBERG, M.-E., ORSINI, G., HÖGBERG-RAIBAUD, A. & RAIBAUD, A. (1975) in: Proc. 10th FEBS Meeting Paris, Vol.40 (DESNUELLE, P. & MICHELSON, A. eds.), S.25-34, North-Holland Publ.Comp. Amsterdam
- 211 Organikum, 12.Aufl. (1973) VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin
- 212 OCHOA, S. (1955) Meth.Enz. 1, 688
- 213 EGGERER, H. & LYNEN, F. (1962) Biochem.Z. 335, 540-547
- 214 HALESTRAP, A.P. & DENTON, R.M. (1973) Biochem.J. 132, 509-517

- 215 ZIEGENHORN, J. & LYNEN, F. (1974) in: Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMAYER, H.U. ed.), 3. Aufl., S. 2083-2086, Verlag Chemie Weinheim
- 216 KUHN, R. & QUADBECK, G. (1951) Chem. Ber. 84, 844-847
- 217 GERSTEIN, J. & JENCKS, W.P. (1964) J. Amer. Chem. Soc. 86, 4655
- 218 MICHAELIS, L. & SCHUBERT, M.P. (1934) J. Biol. Chem. 106, 331-341
- 219 GOODMAN, L., ROSS, L.O. & BAKER, B.R. (1958) J. Org. Chem. 23, 1251-1257
- 220 FINKLE, B.J. & SMITH, E.L. (1958) J. Biol. Chem. 230, 669-690
- 221 KARRER, P. & SCHMID, H. (1944) Helv. Chim. Acta 27, 1280-1284
- 222 DE MARCO, C., RIVA, F. & DUPRE, S. (1964) Analyt. Biochem. 8, 269-271
- 223 HAMILTON, C.S. & SIMPSON, C.L. (1929) J. Amer. Chem. Soc. 51, 3158-3161
- 224 GRAY, W.R. (1972) Meth. Enz. 25, 121-138
- 225 EDMAN, P. & LAUBER, K. (1956) Acta Chem. Scand. 10, 466-467
- 226 BEISENHERZ, G., BOLTZ, H.J., BÜCHER, T., CZOK, R., GARBADE, K.H., MEYER-ARENDE, E. & FLEIDERER, G. (1953) Z. Naturf. 8b, 555-577
- 227 WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. (1942) Biochem. Z. 310, 384-421
- 228 LAYNE, E. (1957) Meth. Enz. 3, 447
- 229 Technical Bulletin No. 13, Nuclear-Chicago
- 230 biochemica-Dienst No. 29 (1975), Fa. Boehringer Mannheim
- 231 WHITE III, H.B., MITSUHASHI, O. & BLOCH, K. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4751-4754
- 232 ELLMAN, G.L. (1959) Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77
- 233 CAFFREY, M. & KINSELLA, J.E. (1975) Int. J. Biochem. 6, 877-883
- 234 EGGERT, J., HOCK, I. & SCHWAB, G.-M. (1968) Lehrbuch der physikalischen Chemie, 9. Aufl., S. 761, Hirzel-Verlag Stuttgart
- 235 PIRSON, W., SCHUHMAN, L. & LYNEN, F. (1973) Eur. J. Biochem. 36, 16-24
- 236 BENISEK, W.F., RAFTERY, M.A. & COLE, R.D. (1967) Biochemistry 6, 3780-3790
- 237 KIRCHNER, J.G. (1967) in: Thin-Layer Chromatography, Techniques in Organic Chemistry Vol. 12 (PEERY, E.S. & WEISSBERGER, A. eds.), S. 148-186, John Wiley & Sons London
- 238 Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie (1970) Firmenschrift Fa. E. Merck, Darmstadt
- 239 CZOK, R. & LAMPRECHT, W. (1974) in: Methoden der enzymatischen Analyse (BERGMAYER, H.U. ed.), 3. Aufl., S. 1491-1496, Verlag Chemie Weinheim
- 240 Sephadex - Gel filtration in theory and practice (1971), Firmenschrift Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala
- 241 KONIGSBERG, W. (1972) Meth. Enz. 25, 185-188
- 242 BROWN, J.R. & HARTLEY, B.S. (1966) Biochem. J. 101, 214-228
- 243 BIDDLEMAN, T.F., NOWLAN, B. & FREI, R.W. (1972) Anal. Chim. Acta 60, 13

Lebenslauf

Ich wurde am 30. Oktober 1946 in Berlin-Frohnau geboren. Meine Eltern sind der Chemiker Prof. Dr.-Ing. Günter Kresze und seine Frau Elisabeth, geb. Ehrhardt.

1953 - 1957	Evangelische Grundschule, Berlin-Frohnau
1957 - 1961	Canisius-Kolleg Gymnasium (humanistisch), Berlin-Tiergarten
1961	Umzug nach München
1961 - 1966	Maximilians-Gymnasium (humanistisch), München
Juli 1966	Abitur
Oktober 1966 - April 1968	Wehrdienst bei der Bundeswehr
SS 1968	Beginn des Chemiestudiums an der Universität München
März 1970	Diplom-Vorprüfung
Juni 1972	Diplom-Hauptprüfung
Juli 1972 - Januar 1976	Anfertigung der Diplom- und Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. F. Lynen.

Ich bin verheiratet und habe eine Tochter.

